

September 2019

# QIAamp<sup>®</sup> DSP Circulating NA Kit Gebruiksaanwijzing (Handleiding)

Versie 1



50

**IVD**

**CE**

**REF**

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 **MAT**

1118364NL

# Inhoud

Beoogd gebruik.....	4
Samenvatting en uitleg .....	4
Principes van de procedure.....	5
Monstervolumes .....	5
Lyseren van monsters .....	7
Adsorptie aan het QIAamp Mini-kolommembraan .....	7
Achtergebleven verontreinigingen verwijderen .....	7
Elutie van zuivere nucleïnezuren.....	8
Opbrengst en lengte van nucleïnezuren .....	8
Omschrijving van protocollen .....	9
Meegeleverde materialen .....	10
Inhoud van de kit .....	10
Benodigde maar niet meegeleverde materialen.....	11
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.....	12
Opslag en verwerking van reagentia.....	15
Bewaren en hanteren van specimen.....	16
Procedure.....	17
Vorbereiding van buffers en reagentia.....	24
Breeze-protocol: zuivering van circulerende nucleïnezuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma .....	27
Classic-protocol: zuivering van circulerende nucleïnezuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma .....	32

---

Kwaliteitscontrole .....	37
Beperkingen .....	37
Symbolen .....	38
Referenties.....	40
Contactgegevens.....	40
Problemen oplossen .....	41
Bijlage A: Aanbeveling voor scheiden en bewaren van bloedplasma.....	44
Bijlage B: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA .....	46
Bestelgegevens.....	47
Revisiegeschiedenis van handleiding.....	48

---

# Beoogd gebruik

De QIAamp DSP Circulating NA Kit is een systeem voor isolatie en zuivering van circulerend celvrij DNA en RNA uit menselijke bloedplasmamonsters met behulp van silicamembraantechnologie (QIAamp-technologie).

Het product is bedoeld voor toepassing door beroepsmatige gebruikers, bijvoorbeeld analisten en artsen die zijn opgeleid in moleculair-biologische technieken.

De QIAamp DSP Circulating NA Kit is bedoeld voor gebruik in de in-vitrodiagnostiek.

## Samenvatting en uitleg

Vrij circulerende nucleïnezuren zijn aanwezig in menselijk plasma, doorgaans als korte fragmenten, < 1000 bp (DNA); < 1000 nt (RNA), of zelfs met een lengte van slechts 20 nt (miRNA's). De concentratie van vrij circulerende nucleïnezuren in menselijk bloedplasma is doorgaans laag en varieert aanzienlijk tussen verschillende personen tussen 1–100 ng/ml in menselijke monsters (1–5).

De QIAamp DSP Circulating NA Kit maakt doeltreffende zuivering mogelijk van circulerende nucleïnezuren uit menselijk plasma. De monsters kunnen vers of bevroren zijn. Extension Tubes en vacuümverwerking op de QIAvac 24 Plus maken uitgangsmonstervolumes mogelijk van maximaal 5 ml en dankzij flexibele elutie volumes tussen 20–150 µl is concentratie mogelijk van soorten nucleïnezuren die aanwezig zijn in lage concentraties.

Geëluëerd vrij circulerend genomisch DNA of RNA is gereed voor gebruik in vervolprocedures of geschikt om te worden bewaard. De QIAamp DSP Circulating NA Kit biedt doeltreffende verwijdering van eiwitten, nucleases en andere verontreinigingen.

---

# Principes van de procedure

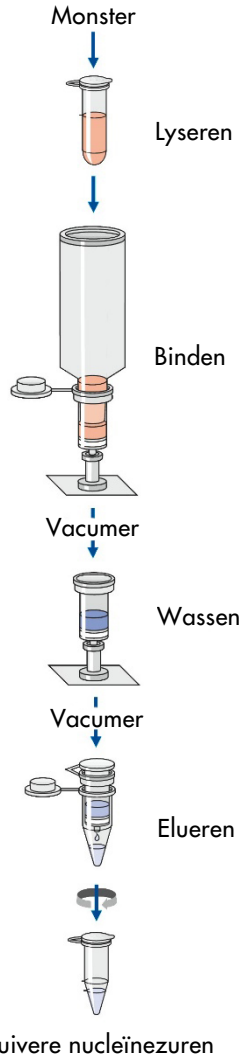
De QIAamp DSP Circulating NA-procedure bestaat uit 4 stappen (lyseren, binden, wassen en elueren) en wordt uitgevoerd met behulp van QIAamp Mini-kolommen op het QIAvac-systeem. Dankzij de krachtige procedure wordt kruisbesmetting tussen monsters tot een minimum beperkt en wordt de veiligheid van de gebruiker vergroot bij het hanteren van mogelijk infectieuze monsters.

De eenvoudige procedure is geschikt voor gelijktijdige verwerking van maximaal 24 monsters in minder dan 2 uur.

## Monstervolumes

QIAamp Mini-kolommen binden gefragmenteerde nucleïnezuren met een lengte van slechts 20 nt, maar de opbrengst hangt af van het monstervolume en de concentratie circulerende nucleïnezuren in het monster (doorgaans 1–100 ng/ml in plasma). De QIAamp DSP Circulating NA-procedure is geoptimaliseerd voor monstervolumes van maximaal 5 ml.

Procedure met QIAamp  
DSP Circulating NA Kit



Afbeelding 1. Overzicht van de procedure met de QIAamp DSP Circulating NA Kit

---

## Lyseren van monsters

Vrij circulerende nucleïne-zuren in biologische vloeistoffen zijn doorgaans gebonden aan eiwitten of omhuld in blaasjes, waardoor een doeltreffende lysestap nodig is voor vrijgave van de nucleïne-zuren voor selectieve binding aan de QIAamp Mini-kolom. Daarom worden de monsters bij verhoogde temperaturen gelyseerd onder zeer denaturerende omstandigheden en bij aanwezigheid van proteïnase K en Buffer ACL, wat zorgt voor inactivering van DNases en RNases en vrijgave van nucleïne-zuren uit gebonden eiwitten, lipiden en blaasjes.

## Adsorptie aan het QIAamp Mini-kolommembraan

Voor optimale binding van de circulerende nucleïne-zuren aan het membraan worden de bindingscondities aangepast door toevoeging van Buffer ACB aan het lysaat. Vervolgens worden de lysaten aangebracht op een QIAamp Mini-kolom en met behulp van vacuümdruk door het silicamembraan geperst, waardoor de circulerende nucleïne-zuren worden geadsorbeerd uit een groot volume. Dankzij zout en pH-condities blijft het merendeel van de eiwitten en andere verontreinigingen die een remmende invloed kunnen hebben op PCR en andere enzymatische vervolgbepalingen niet gebonden aan het QIAamp Mini-kolommembraan.

Voor het protocol zijn een vacuümverdeelstuk (zoals de QIAvac 24 Plus met het QIAvac Connecting System) en een vacuümpomp waarmee een vacuüm van ~800–900 mbar kan worden voortgebracht (zoals QIAGEN® Vacuum Pump) nodig. Er moet een Vacuum Regulator worden gebruikt (onderdeel van het QIAvac Connecting System) voor eenvoudige bewaking van de vacuümdruk en handige opheffing van het vacuüm.

## Achtergebleven verontreinigingen verwijderen

Nucleïne-zuren blijven gebonden aan het membraan, terwijl verontreinigingen doeltreffend worden weggespoeld tijdens 3 wasstappen.

---

## Elutie van zuivere nucleïnezuren

Elutie wordt uitgevoerd met behulp van Buffer AVE. Vervolgens worden hoogzuivere circulerende nucleïnezuren in één stap geëluëerd in Buffer AVE en op kamertemperatuur gebracht. Er kan een flexibel elutievolume van 50–150 µl worden toegepast. Als er hogere nucleïnezuurconcentraties nodig zijn, kan het elutievolume worden verlaagd tot minimaal 20 µl. Kleinere elutievolumes dan 50 µl leiden tot meer geconcentreerde nucleïnezureluaten, maar leiden tot een lagere totale opbrengst.

Het volume aan eluaat dat wordt verkregen, kan maximaal 5 µl minder zijn dan het volume elutiebuffer dat op de kolom is aangebracht.

## Opbrengst en lengte van nucleïnezuren

De opbrengst van vrij circulerende nucleïnezuren die zijn geïsoleerd uit biologische monsters ligt normaal onder 1 µg en is daarom lastig vast te stellen met een spectrofotometer. De absolute opbrengst van circulerend DNA en RNA dat is verkregen uit een monster met behulp van de QIAamp DSP Circulating NA Kit varieert tussen monsters van verschillende personen en hangt ook af van andere factoren (zoals bepaalde ziekte-toestanden). Als er bovendien drager-RNA aanwezig is in de geëxtraheerde nucleïnezuren, domineert dit waarschijnlijk de UV-absorptiewaarden (zie pagina 25). Voor het bepalen van de opbrengst wordt geadviseerd om gebruik te maken van kwantitatieve amplificatiemethoden.

De lengteverdeling van circulerende nucleïnezuren die zijn gezuiverd met gebruik van de QIAamp DSP Circulating NA Kit kan worden gecontroleerd aan de hand van agarosegel-elektroforese of hybridisatie met een doelspecifieke gelabelde probe<sup>5</sup> of een microfluidische elektroforese-oplossing (zoals Agilent Bioanalyzer).



---

## Omschrijving van protocollen

In deze handleiding worden twee verschillende protocollen behandeld.

Het "Breeze-protocol: zuivering van circulerende nucleïnezuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma" (pagina 27) is bestemd voor verwerking van maximaal 5 ml plasma in stappen van 1 ml en is geoptimaliseerd wat betreft weinig handelingen en de uitvoeringstijd.

Het "Classic-protocol: zuivering van circulerende nucleïnezuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma" (pagina 32) is bestemd voor verwerking van maximaal 5 ml plasma in stappen van 1 ml en is het ongewijzigde protocol uit revisie 3 (R3) van de handleiding van de QIAamp DSP Circulating NA Kit.

# Meegeleverde materialen

## Inhoud van de kit

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
Catalogusnr.			61504
Aantal preparaten			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini-kolommen met wasbuisjes) (WT) (2 ml)	<b>COL</b>	50
EXT	Column Extenders (Kolomverlengers) (20 ml)	<b>COL EXT</b>	2 x 25
WT	Wash Tubes (Wasbuisjes) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	50
ET	Elution Tubes (Elutiebuisjes) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
VC	VacConnectors	<b>VAC CON</b>	50
ACL*	Lysis Buffer (Lysebuffer)*	<b>LYS BUF</b>	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Bindingsbuffer) (concentraat)*	<b>BIND BUF CONC</b>	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1 (Wasbuffer 1) (concentraat)*	<b>WASH BUF 1 CONC</b>	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2 (Wasbuffer 2) (concentraat)†	<b>WASH BUF 2 CONC</b>	13 ml
AVE†	Elution Buffer (Elutiebuffer) (paarse dopjes)†	<b>ELU BUF</b>	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (QIAGEN proteïnase K)	<b>PROTK</b>	4 x 7 ml
Drager	Carrier RNA (Drager-RNA) (rode dopjes)	<b>CAR RNA</b>	310 µg
	Handleiding	<b>H B</b>	1

\* Bevat een chaotroop zout. Zie pagina 12 voor Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.

† Bevat natriumazide als conserveermiddel.

# Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Verzeker u ervan dat de apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

Voor alle protocollen

- Pipetten (afstelbaar)
- Steriele pipetpunten (pipetpuntjes met aerosolfilter worden aangeraden om kruisbesmetting te voorkomen)
- Waterbad of verwarmingsblok dat geschikt is voor centrifugebuisjes van 50 ml bij 56 °C of 60 °C\*
- Verwarmingsblok of soortgelijk apparaat bij 56 °C dat geschikt is voor wasbuisjes van 2 ml (alleen voor het Classic-protocol)\*
- Microcentrifuge (met rotor voor buisjes van 2 ml)\*
- Centrifugebuisjes van 50 ml
- QIAvac 24 Plus vacuüm manifold (cat.nr. 19413)
- QIAvac Connecting System (cat.nr. 19419) of vergelijkbaar
- Vacuum Pump (cat.nr. 84010 [VS en Canada], 84000 [Japan] of 84020 [overige landen]) of vergelijkbare pomp die een vacuüm kan produceren van –800 tot –900 mbar
- Ethanol (96–100%)†
- Isopropanol (100%)
- IJsschaafsel (alleen voor het "Classic-protocol: zuivering van circulerende nucleïnezuuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma".)
- Sommige monsters moeten mogelijk worden verdund met PBS-buffer (phosphate-buffered saline)
- Optioneel: VacValves (cat.nr. 19408)

\* Zorg ervoor dat de instrumenten worden gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

† Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

# Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB). Deze zijn online beschikbaar in handig en compact pdf-formaat via [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Hier kunt u de VIB van alle kits en kitcomponenten van QIAGEN vinden, bekijken en afdrukken.

**WAARSCHUWING** Risico op lichamelijk letsel



Voeg **GEEN** bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.

Buffer ACL, Buffer ACB en Buffer ACW1 bevatten guanidinezouten, die met bleekwater sterk reactieve verbindingen kunnen vormen.

Als u een vloeistof hebt gemorst die deze buffer bevat, moet deze worden opgenomen met een geschikt laboratoriumdetergens en water. Reinig de verontreinigde plek eerst met laboratoriumreinigingsmiddel en water en vervolgens met 1% (v/v) natriumhypochloriet als de gemorste vloeistof mogelijk infectieuze stoffen bevat.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de onderdelen van de QIAamp DSP Circulating NA Kit.

## Buffer ACB



Bevat: guanidiniethiocynaat. Gevaar! Schadelijk bij opname door de mond. Kan schadelijk zijn bij contact met de huid of bij inademing. Veroorzaakt ernstige brandwonden op de huid en schade aan het oog. Schadelijk voor het waterleven, met effecten op de lange termijn. Bij contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Raadpleeg onmiddellijk een GIFCENTRUM of arts.

## Buffer ACL



Bevat: guanidiniethiocynaat. Gevaar! Schadelijk bij opname door de mond. Kan schadelijk zijn bij contact met de huid of bij inademing. Veroorzaakt ernstige brandwonden op de huid en schade aan het oog. Schadelijk voor het waterleven, met effecten op de lange termijn. Bij contact met zuren komt zeer giftig gas vrij. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig spoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Raadpleeg onmiddellijk een GIFCENTRUM of arts.

## Buffer ACW1



Bevat: guanidinehydrochloride. Waarschuwing! Schadelijk bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming.

## Proteïnase K



Bevat: proteïnase K. Gevaarlijk! Licht irriterend voor de huid. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Draag beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming. Adembescherming dragen. Bij blootstelling of zorgen: een GIFCENTRUM of arts raadplegen. Breng de persoon in de frisse lucht, in een houding die het ademen vergemakkelijkt.

---

# Opslag en verwerking van reagentia

QIAamp Mini-kolommen moeten droog worden bewaard bij 2–8 °C. Alle buffers moeten bij kamertemperatuur (15–25 °C) worden bewaard. QIAamp Mini-kolommen en buffers kunnen onder deze omstandigheden worden bewaard tot de vervaldatum die op de doos van de kit staat vermeld zonder dat de prestaties ervan achteruitgaan.

Gelyofiliseerd drager-RNA moet tot de vervaldatum op het etiket van de component worden bewaard bij kamertemperatuur (15–25 °C). Drager-RNA moet worden opgelost in Buffer AVE; opgelost drager-RNA moet onmiddellijk worden toegevoegd aan Buffer ACL, zoals beschreven op pagina 28 voor het Breeze-protocol en op pagina 33 voor het Classic-protocol. Deze oplossing moet vers worden bereid en is maximaal 48 uur stabiel bij 2–8 °C. Ongebruikte porties drager-RNA dat is opgelost in Buffer AVE moeten worden ingevroren in aliquots bij –30 tot –15 °C.

De QIAamp DSP Circulating NA Kit bevat een gebruiksklare proteïnase K-oplossing, die wordt opgelost in een speciaal samengestelde opslagbuffer. De proteïnase K is bij kamertemperatuur (15–25 °C) stabiel tot de vervaldatum op het etiket van de component.

# Bewaren en hanteren van specimen

## Bewaren en hanteren van bloed

Om afbraak van celvrije nucleïnezuren en vrijgave van cellulaire nucleïnezuren te voorkomen, raden wij aan volbloed te bewaren gedurende maximaal 6 uur bij 2–8 °C (bijvoorbeeld EDTA-monsters). Neem bij gebruik van gestabiliseerde bloedafnamebuisjes de opslagomstandigheden van de fabrikant in acht. Wij raden aan deze opslagomstandigheden te valideren in combinatie met uw specifieke vervolprocedure en doel.

## Bewaren en hanteren van plasma

Het wordt aangeraden om de plasmascheiding en nucleïnezuurisolatie onmiddellijk na bloedafname uit te voeren wanneer EDTA als antistollingsmiddel wordt gebruikt, met name voor RNA. Voor kortdurende opslag van maximaal 24 uur kan het plasma worden bewaard bij 2-8 °C.

Voor langere opslag kunnen plasma-aliquots uit gestabiliseerde en niet-gestabiliseerde bloedafnamebuisjes worden bewaard bij –20 °C (alleen voor DNA als doel) of –80 °C (DNA en RNA als doel) gedurende minstens 4 weken.

## Bewaren van geëluëerde nucleïnezuren

De geëluëerde nucleïnezuren worden verzameld in elutiebusjes van 1,5 ml (meegeleverd). De gezuiverde circulerende nucleïnezuren kunnen gedurende maximaal 24 uur worden bewaard bij 2–8 °C. Voor langere bewaarperioden dan 24 uur wordt opslag bij –30 tot –15 °C aangeraden voor vervolprocedures met DNA en –90 tot –60 °C voor vervolprocedures met RNA.



---

# Procedure

Wat u moet weten voordat u begint

## De QIAvac 24 Plus

De QIAvac 24 Plus is ontworpen voor snelle en doeltreffende parallelle vacuümverwerking van maximaal 24 QIAGEN-spinkolommen. Monsters en wasoplossingen passeren de kolommembranen met behulp van vacuüm in plaats van centrifugatie. Dit biedt een hogere snelheid en verminderde hands-on tijd in zuiveringsprocedures.

In combinatie met het QIAvac Connecting System kan de QIAvac 24 Plus als een doorloopsysteem worden gebruikt. Het doorgelopen monster wordt opgevangen in een afzonderlijke afvalfles.

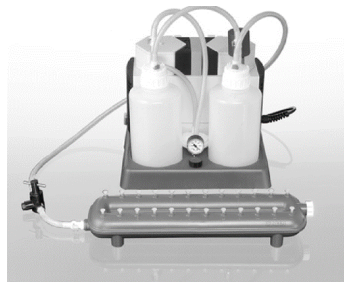
Voor onderhoud van de QIAvac 24 Plus raadpleegt u de richtlijnen voor hantering in Handleiding van de QIAvac 24 Plus.

## QIAamp Mini-kolommen verwerken in de QIAvac 24 Plus

QIAamp Mini-kolommen worden in de QIAvac 24 Plus verwerkt met gebruik van wegwerpbare VacConnectors en herbruikbare VacValves. VacValves (optioneel) worden rechtstreeks in de luer-sleuven op het QIAvac 24 Plus-verdeelstuk geplaatst en zorgen voor een gelijkmatige flowsnelheid, zodat parallelle verwerking van verschillende monstervolumes mogelijk is. Deze dienen te worden gebruikt om een consistent vacuüm te handhaven als de flowsnelheden van monsters aanzienlijk verschillen. VacConnectors zijn wegwerpbare connectoren die tussen QIAamp Mini-kolommen en VacValves kunnen worden geplaatst, of tussen de QIAamp Mini-kolommen en de luer-sleuven op de QIAvac 24 Plus. Deze voorkomen direct contact tussen de spinkolom en VacValve tijdens de zuivering, zodat kruisbesmetting tussen monsters wordt vermeden. VacConnectors moeten na eenmalig gebruik worden weggegooid. Vanwege de grote oplossingsvolumes moet het QIAvac Connecting System (of een vergelijkbare opstelling met afvalflessen) worden gebruikt (zie Afbeelding 2).

## Richtlijnen voor hantering van de QIAvac 24 Plus

- Plaats de QIAvac 24 Plus altijd op een stevig werkblad. Als het QIAvac 24 Plus-verdeelstuk valt, kan dit kapot gaan.
- De QIAvac 24 Plus moet altijd schoon en droog worden bewaard. Zie de handleiding van de QIAvac 24 Plus voor de reinigingsprocedures.
- De componenten van de QIAvac 24 Plus zijn niet bestand tegen bepaalde oplosmiddelen (Tabel 1). Als deze oplosmiddelen op het apparaat worden gemorst, moet het grondig met water worden afgespoeld.
- Om consistente prestaties te waarborgen, mag geen siliconen- of vacuümvet worden aangebracht op enig onderdeel van het QIAvac 24 Plus-verdeelstuk.
- Wees altijd voorzichtig en draag een veiligheidsbril wanneer u in de buurt van een vacuümverdeelstuk onder druk werkt.
- Neem contact op met de technische dienst van QIAGEN of met uw plaatselijke leverancier voor meer informatie over reserve- of vervangende onderdelen.
- De vacuümdruk is het drukverschil tussen de binnenkant van het vacuümverdeelstuk en de omgeving (standaard atmosferische druk 1013 millibar of 760 mm Hg) en kan worden gemeten met behulp van het QIAvac Connecting System (zie Afbeelding 2). Voor de protocollen is een vacuümpomp vereist die een vacuüm kan produceren van –800 tot –900 mbar (zoals de QIAGEN Vacuum Pump). Een hogere vacuümdruk moet worden vermeden. Het gebruik van een lagere vacuümdruk dan aanbevolen kan leiden tot een verminderde opbrengst en zuiverheid van de nucleïnezuren en een verhoogd risico op verstopte membranen.



Afbeelding 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System en vacuümpomp

Tabel 1. Chemische weerstandseigenschappen van QIAvac 24 Plus

Bestand tegen		Niet bestand tegen
Azijnzuur	Chaotrope zouten	Benzeen
Chroomzuur	Geconcentreerde alcoholen	Fenol
SDS	Natriumchloride	Chloroform
Tween® 20	Ureum	Tolueen
Chloorbleek	Zoutzuur	Ethers
Natriumhydroxide		

## Opstelling van het QIAvac 24 Plus vacuüm manifold

1. Sluit de QIAvac 24 Plus aan op een vacuümbron. Bij gebruik van het QIAvac Connecting System sluit u het systeem aan op het verdeelstuk en de vacuümbron zoals beschreven in bijlage A van Handleiding van de QIAvac 24 Plus.
2. Plaats een VacValve (optioneel) in elke luer-sleuf van de QIAvac 24 Plus die moet worden gebruikt (zie Afbeelding 3). Sluit ongebruikte luer-sleuven met luer-doppen of sluit de geplaatst VacValve.

Er moeten VacValves worden gebruikt als de flowsnelheden van de monsters aanzienlijk verschillen om een consistent vacuüm te handhaven.

3. Plaats een VacConnector in elke VacValve (zie Afbeelding 3).

Voer deze stap uit direct voordat u de zuivering start om te voorkomen dat VacConnectors worden blootgesteld aan mogelijke verontreinigingen in de lucht.

4. Plaats de QIAamp Mini-kolommen in de VacConnectors op het verdeelstuk (zie Afbeelding 3).

Opmerking: Houd het wasbuisje uit de blisterverpakking apart voor gebruik in het zuiveringsprotocol.

5. Plaats een kolomverlenger (20 ml) in elke QIAamp Mini-kolom (zie Afbeelding 3).

Opmerking: Controleer of de kolomverlenger stevig in de QIAamp Mini-kolom is geplaatst om lekken van monsters te voorkomen.

- 
6. Volg de instructies in de protocollen voor zuivering van nucleïnezuren. Gooi de VacConnectors na gebruik op de juiste wijze weg.

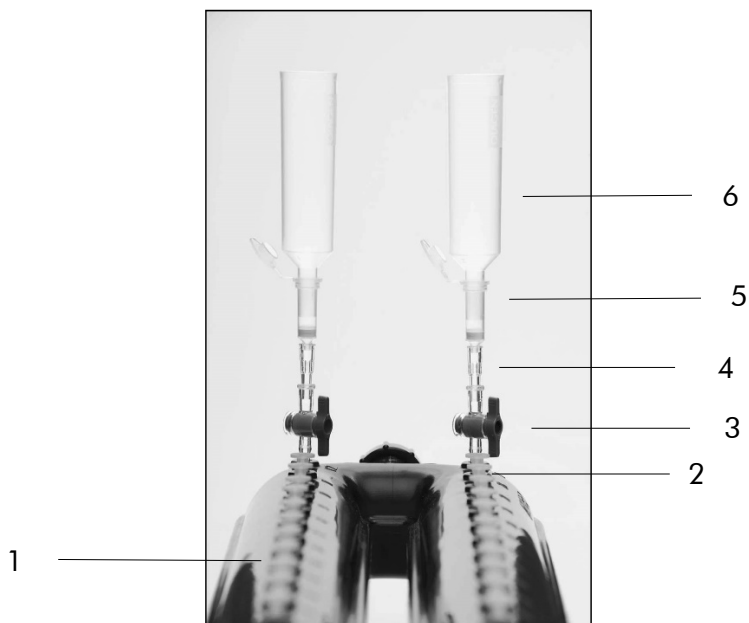
Laat het dopje van de QIAamp Mini-kolom geopend terwijl vacuüm wordt toegepast.

Schakel het vacuüm tussen de stappen uit om te garanderen dat er tijdens de verwerking een consistent, gelijkmatig vacuüm wordt toegepast. Voor sneller opheffen van het vacuüm moet een Vacuum Regulator worden gebruikt (onderdeel van het QIAvac Connecting System).

Opmerking: Elke VacValve kan afzonderlijk worden gesloten zodra het volledige monster de spinkolom is gepasseerd. Op deze manier is parallele verwerking van monsters met verschillende volumes of viscositeiten mogelijk.

7. Na het verwerken van monsters reinigt u de QIAvac 24 Plus (zie "Reinigen en ontsmetten van de QIAvac 24 Plus" in Handleiding van de QIAvac 24 Plus).

Opmerking: De buffers ACL, ACB en ACW1 zijn niet compatibel met desinfectiemiddelen die bleek bevatten. Zie pagina 12 voor Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.

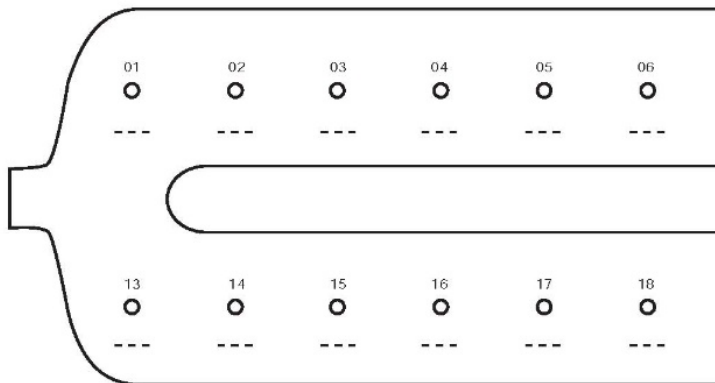


Afbeelding 3. Opstelling van de QIAvac 24 Plus met QIAamp Mini-kolommen met gebruik van VacValves, VacConnectors en kolomverlengers.

- |  |                     |
|--|---------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuüm manifold                           | 4 VacConnector      |
| 2 Luer-sleuf van de QIAvac 24 Plus (gesloten met luer-dop) | 5 QIAamp Mini-kolom |
| 3 VacValve**   | 6 Kolomverlenger    |

Wij adviseren om de buisjes en de QIAamp Mini-kolommen te etiketteren voor gebruik met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem, conform het schema in Afbeelding 4 om te voorkomen dat monsters door elkaar worden gehaald. U kunt deze afbeelding kopiëren en op de kopie de namen van de monsters invullen.

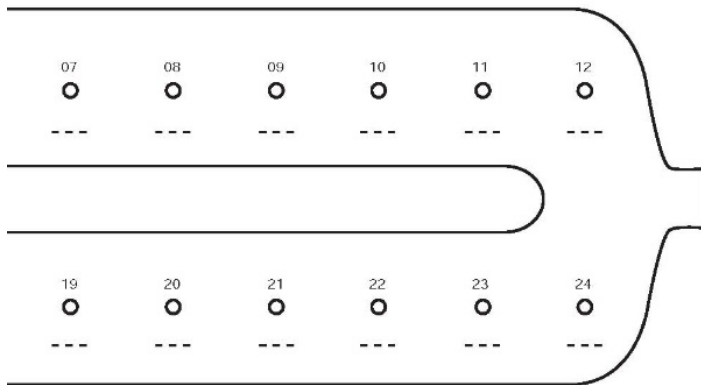
\* Moet afzonderlijk worden aangeschaft.



Datum: \_\_\_\_\_

Gebruiker: \_\_\_\_\_

Run-ID: \_\_\_\_\_



Afbeelding 4. Etiketteerschema voor buisjes en QIAamp Mini-kolommen voor gebruik met het QIAvac 24 Plus-vacuümsysteem

# Vorbereiding van buffers en reagentia

## Buffer ACB

Voeg voorafgaand aan het gebruik 200 ml isopropanol (100%) toe aan 300 ml Buffer ACB-concentraat om 500 ml Buffer ACB te verkrijgen. Meng goed na het toevoegen van isopropanol.

## Buffer ACW1 \*

Voeg voorafgaand aan het gebruik 25 ml ethanol (96–100%) toe aan 19 ml Buffer ACW1-concentraat om 44 ml Buffer ACW1 te verkrijgen. Meng goed na het toevoegen van ethanol.

## Buffer ACW2 †

Voeg voorafgaand aan het gebruik 30 ml ethanol (96–100%) toe aan 13 ml Buffer ACW2-concentraat om 43 ml Buffer ACW2 te verkrijgen. Meng goed na het toevoegen van ethanol.

## Drager-RNA toevoegen aan Buffer ACL\*

Drager-RNA dient twee doeleinden: in de eerste plaats verbetert het de binding van nucleïnezuren aan het QIAamp Mini-membraan, vooral als het monster zeer weinig doelmoleculen bevat. In de tweede plaats verlaagt het toevoegen van grote hoeveelheden drager-RNA de kans op RNA-afbraak, in het zeldzame geval dat RNase-moleculen ontsnappen aan denaturatie door de chaotrope zouten en detergenten in Buffer ACL.

De geleverde hoeveelheid gelyofiliseerd drager-RNA is voldoende voor het volume van Buffer ACL dat met de kit wordt meegeleverd. De aanbevolen concentratie drager-RNA is aangepast, zodat het QIAamp DSP Circulating NA-protocol kan worden gebruikt als algemeen zuiveringssysteem dat compatibel is met veel verschillende amplificatiesystemen en geschikt is voor een breed scala aan RNA- en DNA-doelen.

\* Bevat chaotroop zout. Zie pagina 12 voor waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.

† Bevat natriumazide als conserveermiddel.



---

De effectiviteit van amplificatiesystemen is afhankelijk van de totale hoeveelheid nucleïnezuren die aanwezig zijn in de reactie. Eluaten uit de kit bevatten zowel circulerende nucleïnezuren als drager-RNA. De hoeveelheid drager-RNA is in de meeste gevallen echter veel hoger dan de hoeveelheid circulerende nucleïnezuren. Daarom is kwantificatie van geïsoleerde circulerende nucleïnezuren aan de hand van een UV-absorptiemeting niet toereikend, aangezien de resultaten van dergelijke metingen worden bepaald door de aanwezigheid van drager-RNA.

Om amplificatiereacties zo gevoelig mogelijk te maken, kan het nodig zijn om de hoeveelheid drager-RNA dat wordt toegevoegd aan Buffer ACL te verlagen.

Voor amplificatiesystemen met oligo dT-primers mag geen drager-RNA worden toegevoegd tijdens de isolatie van vrij circulerende nucleïnezuren.

Voeg 1550 µl Buffer AVE\* toe aan het buisje met 310 µg gelyofiliseerd drager-RNA om een oplossing van 0,2 µg/µl concentratie te verkrijgen. Los het drager-RNA geheel op, verdeel de oplossing in handzame aliquots en bewaar deze bij -30 tot -15 °C. Ontdooi de ingevroren aliquots drager-RNA niet vaker dan 3 keer.

Drager-RNA lost niet op in Buffer ACL. Het moet eerst worden opgelost in Buffer AVE en vervolgens worden toegevoegd aan Buffer ACL.

Bereken het volume van het mengsel van Buffer ACL en drager-RNA dat nodig is voor een batch monsters aan de hand van de tabellen in de protocollen. Bepaal hoeveel monsters gelijktijdig moeten worden verwerkt.

Meng de inhoud voorzichtig door het buisje of flesje 10 keer om te keren. Schud de inhoud niet om schuimen te voorkomen.

\* Bevat natriumazide als conserveermiddel.

---

Opmerking: De procedure voor monsterbereiding is geoptimaliseerd voor maximaal 1,0 µg drager-RNA per monster. Breng alleen de vereiste hoeveelheid opgelost drager-RNA over naar de buisjes met Buffer ACL als is uitgewezen dat minder drager-RNA beter is voor uw amplificatiesysteem. Voeg voor elke microgram drager-RNA die per bereiding is vereist 5 µl opgelost drager-RNA toe aan Buffer ACL. (Wanneer minder dan 1,0 µg drager-RNA per monster wordt gebruikt, kan dit gunstig zijn en moet deze hoeveelheid voor elk type monster en vervolgassay afzonderlijk worden gevalideerd.)

---

# Breeze-protocol: zuivering van circulerende nucleïnezuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma

Dit protocol wordt gebruikt voor zuivering van circulerend DNA en RNA uit 1–5 ml menselijk bloedplasma en is geoptimaliseerd wat betreft weinig handelingen en de uitvoeringstijd. Voor bestaande, door de gebruiker gevalideerde workflows met gebruik van de QIAamp DSP Circulating Kit versie 1/R3 raadpleegt u het "Classic-protocol: zuivering van circulerende nucleïnezuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma" (pagina 32).

## Wat u moet weten voordat u begint

- Alle centrifugatiestappen moeten worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Schakel het vacuüm tussen de stappen uit om te garanderen dat er tijdens de protocolstappen een consistent, gelijkmatig vacuüm wordt toegepast.
- Opmerking: De druk van de vacuümpomp moet tussen –800 en –900 mbar liggen.
- Equilibreer monsters op kamertemperatuur.
- Vul het volume van het monster aan met PBS-buffer (phosphate-buffered saline) tot het dichtstbijzijnde exacte volume (1 ml tot 5 ml).
- Zet de QIAvac 24 Plus op zoals beschreven op pagina 19.
- Verwarm een waterbad of verwarmingsblok tot 56 °C voor gebruik met centrifugebuisjes van 50 ml in stap 3.
- Equilibreer de QIAamp Mini-spinkolommen gedurende minstens 1 uur op kamertemperatuur voorafgaand aan het gebruik.
- Zorg dat Buffer ACB, Buffer ACW1 en Buffer ACW2 zijn voorbereid (toevoeging van isopropanol of ethanol) volgens de instructies op pagina 24.
- Voeg drager-RNA dat is gereconstitueerd in Buffer AVE toe aan Buffer ACL volgens de instructies in Tabel 2.

Tabel 2. Volume van Buffer ACL en drager-RNA (opgelost in Buffer AVE) dat nodig is voor verwerking van 1–5 ml menselijke bloedplasmamonsters

Opstelling voor ml plasma	A	B	C	D	E	Drager-RNA in Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Aantal monsters	Buffer ACL (ml)					
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Procedure: Breeze-protocol

1. Pipetteer QIAGEN Proteinase K, plasma en Buffer ACL in deze volgorde in een centrifugebuisje van 50 ml (niet meegeleverd).

Opstelling	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Sluit het dopje en meng de inhoud gedurende 5 x 2 seconden met een pulse-vortexmixer.

Controleer of er een zichtbare werveling ontstaat in het buisje. Voor efficiënte lyse is het essentieel dat het monster en de Buffer ACL grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.

Opmerking: De procedure mag op dit moment niet worden onderbroken. Ga onmiddellijk verder met stap 3 om de lyse-incubatie te starten.

3. Incubeer gedurende 15 ( $\pm$ 1) minuten bij 56 °C ( $\pm$ 1 °C).
4. Plaats het buisje terug op de werktafel en schroef de dop los.
5. Voeg Buffer ACB toe aan het lysaat in het buisje. Kies het volume aan de hand van de opstelling uit stap 1.

Opstelling	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Sluit het dopje en meng de inhoud gedurende 5 x 2 seconden grondig met een pulse-vortexmixer.

Controleer of er een zichtbare werveling ontstaat in het buisje. Voor efficiënte lyse is het essentieel dat het monster en de Buffer ACB grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.

7. Incubeer het mengsel van lysaat en Buffer ACB in het buisje gedurende 5 ( $\pm$ 1) minuten op kamertemperatuur.

8. Plaats de QIAamp Mini-kolom in de VacConnector op de QIAvac 24 Plus (zie "Opstelling van het QIAvac 24 Plus vacuüm manifold", pagina 19). Plaats een kolomverlenger van 20 ml in de geopende QIAamp Mini-kolom.

Controleer of de kolomverlenger stevig in de QIAamp Mini-kolom is geplaatst om lekken van monsters te voorkomen.

Opmerking: Bewaar het wasbuisje voor het droogcentrifugeren in stap 13.

9. Breng het lysaat uit stap 7 voorzichtig over naar de kolomverlenger van de QIAamp Mini-kolom. Schakel de vacuümpomp in. Wanneer alle lysaten volledig door de kolommen zijn gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar. Verwijder de kolomverlenger voorzichtig en gooi deze weg.

Bij lysaatvolumes van grote monsters (ongeveer 18 ml als u begint met een monster van 5 ml) kan het wel 20 minuten duren om met vacuümkraft het QIAamp Mini-membraan te passeren.

Voor snel en handig opheffen van de vacuümdruk moet de Vacuum Regulator worden gebruikt (onderdeel van het QIAvac Connecting System).

Opmerking: Zorg ervoor dat kolomverlengers niet worden verwijderd over de aangrenzende QIAamp Mini-kolommen heen om kruisbesmetting te voorkomen.

10. Breng 600  $\mu$ l Buffer ACW1 over naar de QIAamp Mini-kolom. Laat het dopje van de kolom geopend en schakel de vacuümpomp in. Nadat alle Buffer ACW1 door de QIAamp Mini-kolom is gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar.

11. Breng 750  $\mu$ l Buffer ACW2 over naar de QIAamp Mini-kolom. Laat het dopje van de kolom geopend en schakel de vacuümpomp in. Nadat alle Buffer ACW2 door de QIAamp Mini-kolom is gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar.

12. Breng 750 µl ethanol (96–100%) over naar de QIAamp Mini-kolom. Laat het dopje van de kolom geopend en schakel de vacuümpomp in. Nadat alle ethanol door de spinkolom is gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar.
13. Sluit het dopje van de QIAamp Mini-kolom. Verwijder hem uit het vacuümverdeelstuk en gooi de VacConnector weg. Plaats de QIAamp Mini-kolom in een schoon wasbuisje van 2 ml (uit stap 8) en centrifugeer op maximale snelheid (20.000 x g; 14.000 rpm) gedurende 3 (±0,5) minuten.
14. Plaats de QIAamp Mini-kolom in een nieuw wasbuisje van 2 ml. Open het dopje en incubeer het geheel gedurende 3 minuten bij kamertemperatuur om het membraan volledig te drogen.
15. Plaats de QIAamp Mini-kolom in een schoon elutiebuisje van 1,5 ml (meegeleverd) en gooi het wasbuisje van 2 ml uit stap 14 weg. Breng voorzichtig 20–150 µl Buffer AVE over naar het midden van de QIAamp Mini-kolommembraan. Sluit het dopje en incubeer gedurende 3 (±0,5) minuten bij kamertemperatuur.

**Belangrijk:** Controleer of Buffer AVE voor elutie op kamertemperatuur (15 -25 °C) is gebracht. Bij het elueren van kleine volumes (<50 µl) moet de elutiebuffer worden aangebracht op het midden van het membraan, zodat gebonden nucleïneazuren volledig worden geëluëerd.

Het elutievolume is flexibel en kan worden aangepast aan de vereisten van de vervolgprocedures.

Door elutie met kleinere volumes van Buffer AVE stijgen de concentraties nucleïneazuren, maar kan de algehele opbrengst minder zijn.

Het volume van het verkregen eluaat kan maximaal 5 µl minder zijn dan het elutievolume dat is aangebracht op het membraan van de QIAamp Mini-kolom.

**Opmerking:** Als er een lage NZ-opbrengst wordt verwacht, wordt het gebruik van een laag bindend buisje aangeraden voor elutie (niet meegeleverd).

16. Centrifugeer in een microcentrifuge op maximale snelheid (20.000 x g; 14.000 rpm) gedurende 1 minuut om de nucleïneazuren te elueren.

# Classic-protocol: zuivering van circulerende nucleïne-zuren uit 1–5 ml menselijk bloedplasma

Dit is het ongewijzigde protocol uit revisie 3 (R3) van de handleiding van de QIAamp DSP Circulating NA Kit voor gebruik met bijvoorbeeld bestaande, door de gebruiker gevalideerde workflows voor 1-5 ml menselijk plasma.

Wat u moet weten voordat u begint

- Alle centrifugatiestappen moeten worden uitgevoerd bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Schakel het vacuüm tussen de stappen uit om te garanderen dat er tijdens de protocolstappen een consistent, gelijkmatig vacuüm wordt toegepast.  
Opmerking: De druk van de vacuümpomp moet tussen –800 en –900 mbar liggen.
- Equilibreer monsters op kamertemperatuur.
- Vul het volume van het monster aan met PBS-buffer (phosphate-buffered saline) tot het dichtstbijzijnde exacte volume (1 ml tot 5 ml).
- Zet de QIAvac 24 Plus op zoals beschreven op pagina 19.
- Verwarm een waterbad of verwarmingsblok tot 60°C voor gebruik met centrifugebuisjes van 50 ml in stap 3.
- Verwarm een verwarmingsblok tot 56 °C voor gebruik met wasbuisjes van 2 ml in stap 14.
- Equilibreer de QIAamp Mini-spinkolommen gedurende minstens 1 uur op kamertemperatuur voorafgaand aan het gebruik.
- Zorg dat Buffer ACB, Buffer ACW1 en Buffer ACW2 zijn voorbereid (toevoeging van isopropanol of ethanol) volgens de instructies op pagina 24.
- Voeg drager-RNA dat is gereconstitueerd in Buffer AVE toe aan Buffer ACL volgens de instructies in Tabel 3.



Tabel 3. Volume van Buffer ACL en drager-RNA (opgelost in Buffer AVE) dat nodig is voor verwerking van 1–5 ml menselijke bloedplasmamonsters

Opstelling voor ml plasma	A	B	C	D	E	Drager-RNA in Buffer AVE (µl)
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Aantal monsters	Buffer ACL (ml)					
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

## Procedure: Classic-protocol

1. Pipetteer QIAGEN Proteinase K, plasma en Buffer ACL in deze volgorde in een centrifugebuisje van 50 ml (niet meegeleverd).

Opstelling	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Sluit het dopje en meng de inhoud gedurende 30 seconden met een pulse-vortexmixer.  
Controleer of er een zichtbare werveling ontstaat in het busje. Voor efficiënte lyse is het essentieel dat het monster en de Buffer ACL grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.  
Opmerking: De procedure mag op dit moment niet worden onderbroken. Ga onmiddellijk verder met stap 3 om de lyse-incubatie te starten.
3. Incubeer gedurende 30 (±2) minuten bij 60 °C (±1 °C).
4. Plaats het busje terug op de werktafel en schroef de dop los.
5. Voeg Buffer ACB toe aan het lysaat in het busje. Kies het volume aan de hand van de opstelling uit stap 1.

Opstelling	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Sluit het dopje en meng de inhoud gedurende 30 seconden grondig met een pulse-vortexmixer.  
Controleer of er een zichtbare werveling ontstaat in het busje. Voor efficiënte lyse is het essentieel dat het monster en de Buffer ACB grondig worden gemengd tot een homogene oplossing.

7. Incubeer het mengsel van lysaat en Buffer ACB in het buisje gedurende 5 ( $\pm$ 1) minuten op ijs.

8. Plaats de QIAamp Mini-kolom in de VacConnector op de QIAvac 24 Plus (zie "Opstelling van het QIAvac 24 Plus vacuüm manifold", pagina 19). Plaats een kolomverlenger van 20 ml in de geopende QIAamp Mini-kolom.

Controleer of de kolomverlenger stevig in de QIAamp Mini-kolom is geplaatst om lekken van monsters te voorkomen.

Opmerking: Bewaar het wasbuisje voor het droogcentrifugeren in stap 13.

9. Breng het lysaat uit stap 7 voorzichtig over naar de kolomverlenger van de QIAamp Mini-kolom. Schakel de vacuümpomp in en pas een druk toe van  $-800$  tot  $-900$  mbar. Wanneer alle lysaten volledig door de kolommen zijn gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar. Verwijder de kolomverlenger voorzichtig en gooi deze weg.

Bij lysaatvolumes van grote monsters (ongeveer 18 ml als u begint met een monster van 5 ml) kan het wel 20 minuten duren om met vacuümkraft het QIAamp Mini-membraan te passeren.

Voor snel en handig opheffen van de vacuümdruk moet de Vacuum Regulator worden gebruikt (onderdeel van het QIAvac Connecting System).

Opmerking: Zorg ervoor dat kolomverlengers niet worden verwijderd over de aangrenzende QIAamp Mini-kolommen heen om kruisbesmetting te voorkomen.

10. Breng 600  $\mu$ l Buffer ACW1 over naar de QIAamp Mini-kolom. Laat het dopje van de kolom geopend en schakel de vacuümpomp in. Nadat alle Buffer ACW1 door de QIAamp Mini-kolom is gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar.

11. Breng 750  $\mu$ l Buffer ACW2 over naar de QIAamp Mini-kolom. Laat het dopje van de kolom geopend en schakel de vacuümpomp in. Nadat alle Buffer ACW2 door de QIAamp Mini-kolom is gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar.

12. Breng 750 µl ethanol (96–100%) over naar de QIAamp Mini-kolom. Laat het dopje van de kolom geopend en schakel de vacuümpomp in. Nadat alle ethanol door de spinkolom is gepasseerd, schakelt u de vacuümpomp uit en verlaagt u de druk naar 0 mbar.
13. Sluit het dopje van de QIAamp Mini-kolom. Verwijder hem uit het vacuümverdeelstuk en gooi de VacConnector weg. Plaats de QIAamp Mini-kolom in een schoon wasbuisje van 2 ml (uit stap 8) en centrifugeer op maximale snelheid (20.000 x g; 14.000 rpm) gedurende 3 (±0,5) minuten.
14. Plaats de QIAamp Mini-kolom in een nieuw wasbuisje van 2 ml. Open het dopje en incubeer het geheel gedurende 10 (±1) minuten bij 56 °C (±1 °C) om het membraan volledig te drogen.
15. Plaats de QIAamp Mini-kolom in een schoon elutiebuisje van 1,5 ml (meegeleverd) en gooi het wasbuisje van 2 ml uit stap 13 weg. Breng voorzichtig 20–150 µl Buffer AVE over naar het midden van de QIAamp Mini-kolommembraan. Sluit het dopje en incubeer gedurende 3 (±0,5) minuten bij kamertemperatuur.

**Belangrijk:** Controleer of Buffer AVE voor elutie op kamertemperatuur (15 -25 °C) is gebracht. Bij het elueren van kleine volumes (<50 µl) moet de elutiebuffer worden aangebracht op het midden van het membraan, zodat gebonden nucleïne-zuren volledig worden geëluëerd.

Het elutievolume is flexibel en kan worden aangepast aan de vereisten van de vervolgprocedures.

Door elutie met kleinere volumes van Buffer AVE stijgen de concentraties nucleïne-zuren, maar kan de algehele opbrengst minder zijn.

Het volume aan eluaat dat wordt verkregen, kan maximaal 5 µl minder zijn dan het elutievolume dat op de QIAamp Mini-kolom is aangebracht.

**Opmerking:** Als er een lage NZ-opbrengst wordt verwacht, wordt het gebruik van een laag bindend buisje aangeraden voor elutie (niet meegeleverd).

16. Centrifugeer in een microcentrifuge op maximale snelheid (20.000 x g; 14.000 rpm) gedurende 1 minuut om de nucleïne-zuren te elueren.

---

# Kwaliteitscontrole

Elke partij met QIAamp DSP Circulating NA Kits wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest tegen vooraf vastgestelde specificaties, om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

## Beperkingen

De systeemwerking voor het isoleren van circulerende, celvrije nucleïnezuren is vastgesteld met gebruik van menselijke plasmamonsters die zijn afgenomen met de volgende bloedafnamebuisjes:














- K2-EDTA (Beckton Dickinson, cat. nr. 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, cat. nr. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, cat. nr. 218962)

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden uitgevoerd en die niet in de prestatieonderzoeken van QIAGEN worden behandeld.

Om het risico van een negatieve invloed op de diagnostische resultaten zo klein mogelijk te houden, moeten de juiste controles worden gebruikt voor vervolgtoeepassingen. Voor verdere validering worden de richtlijnen van de "International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH)" in: "ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology", aanbevolen.

Gegeneerde diagnostische resultaten moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumresultaten.

# Symbolen

Symbool	Symbooldefinitie
 <N>	Bevat voldoende reagentia voor <N> tests
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Bij aankomst
	Direct na aankomst openen; QIAamp Mini-spinkolommen bewaren bij 2–8 °C
	Catalogusnummer
	Nummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer
	Componenten
	Volume
	Toevoegen
	Temperatuurbeperring



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Schrijf na toevoeging van ethanol aan het flesje de huidige datum op



Ethanol



Schrijf na toevoeging van isopropanol aan het flesje de huidige datum op



Isopropanol



Bevat



Resulteert in



Guanidiniethiocynaat



Guanidinehydrochloride



BRIJ 58



Global Trade Item Number (Artikelnummer wereldhandel)

---

## Referenties

1. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis*. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. 56, 1210-1211.
3. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 15, 541-563.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* 10, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. 57, 932-953.

## Contactgegevens

Ga voor technische ondersteuning en voor meer informatie naar ons centrum voor technische ondersteuning op [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) of bel een van de afdelingen voor technische diensten of plaatselijke leveranciers van QIAGEN (zie de achterzijde van deze handleiding of kijk op [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).



# Problemen oplossen

Deze gids voor probleemoplossing kan helpen bij het oplossen van eventuele problemen. Zie voor contactgegevens de achterzijde van deze gebruiksaanwijzing of ga naar [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Opmerkingen en suggesties

### Weinig of geen nucleïnezuur in het eluaat

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Gebruik van niet-gestabiliseerd plasma                             | Niet-gestabiliseerde plasmamonsters kunnen leiden tot versnelde DNA-degradatie. Wij raden aan CEN/TS 16835-3:2015 in acht te nemen. Herhaal de zuiveringsprocedure met nieuwe monsters.  |
| b) | Langere tijd tussen bloedafname en plasmabereiding                 | Kernhoudende bloedcellen kunnen uiteenvallen en genomisch DNA in het plasma afgeven, waardoor het doelnucleïnezuur wordt verdund.  |
| c) | Monsters zijn meerdere malen bevroren en ontdooid                  | Herhaaldelijk invriezen en ontdooien moet worden vermeden, aangezien dit kan leiden tot DNA-degradatie. Gebruik altijd verse monsters of monsters die slechts eenmaal zijn ontdooid.   |
| d) | Lage concentratie doel-DNA in de monsters                          | Plasmamonsters zijn te lang op kamertemperatuur blijven staan. Herhaal de zuiveringsprocedure met nieuwe monsters<br><br>Opmerking: Sommige personen kunnen een lage celvrije NZ-concentratie in plasma hebben. Hierbij moet een groter monstervolume en een laag eluaatvolume worden gekozen. |
| e) | Inefficiënte monsterlyse in Buffer ACL                             | Als QIAGEN Proteinase K langdurig is blootgesteld aan een hogere temperatuur, kan de activiteit verloren gaan. Herhaal de procedure met nieuwe monsters en verse QIAGEN Proteinase K.  |
| f) | Het mengsel van Buffer ACL en drager-RNA is niet voldoende gemengd | Meng Buffer ACL met drager-RNA door het buisje met Buffer ACL en drager-RNA voorzichtig minstens 10 keer om te keren.  |
| g) | Ethanol met laag percentage gebruikt in plaats van 96–100%         | Herhaal de zuiveringsprocedure met nieuwe monsters en 96–100% ethanol. Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.  |
| h) | Buffer ACB verkeerd voorbereid                                     | Controleer of het concentraat van Buffer ACB is gereconstitueerd met het juiste volume isopropanol (niet ethanol, zie pagina 24).  |
| i) | Buffer ACW1 of Buffer ACW2 verkeerd voorbereid                     | Controleer of de concentraten van Buffer ACW1 en Buffer ACW2 zijn verdund met het juiste volume ethanol (zie pagina 24). Herhaal de zuiveringsprocedure met nieuwe monsters.   |
| j) | Buffer ACW1 of Buffer ACW2 voorbereid met 70% ethanol              | Controleer of de concentraten van Buffer ACW1 en Buffer ACW2 zijn verdund met 96–100% ethanol (zie pagina 24). Herhaal de zuiveringsprocedure met nieuwe monsters.   |

## Opmerkingen en suggesties

### DNA of RNA presteert niet goed in enzymatische vervolgebepalingen

- |    |                                  |  |
|----|----------------------------------|--|
| a) | Weinig of geen DNA in het eluaat | Zie "Weinig of geen nucleïnezuur in het eluaat" hierboven voor mogelijke redenen. Vergroot zo mogelijk de hoeveelheid eluaat dat wordt toegevoegd aan de reactie.  |
| b) | Ongeschikt elutievolume gebruikt | Bepaal het maximale volume van eluaat dat geschikt is voor uw vervolgprocedure. Verlaag of verhoog dienovereenkomstig het volume van het eluaat dat wordt toegevoegd aan de vervolgprocedure. Het elutievolume kan proportioneel worden aangepast.<br><br>Opmerking: Elutie met kleinere volumes van Buffer AVE leidt tot hogere concentraties nucleïnezuur maar kan leiden tot een lagere totale opbrengst. |
| c) | Buffers niet grondig gemengd     | Zout- en ethanolcomponenten van wasbuffer ACW2 zijn mogelijk gescheiden nadat de buffer lang is blijven staan tussen runs. Meng buffers voorafgaand aan elke run altijd grondig.   |
| d) | Interferentie vanwege drager-RNA | Als de aanwezigheid van drager-RNA in het eluaat de enzymatische vervolgebepalingen verstoort, kan het nodig zijn om de hoeveelheid drager-RNA te verlagen of dit helemaal weg te laten.   |

### Algemeen werk

- |    |                             |   |
|----|-----------------------------|---|
| a) | Verstopte QIAamp Mini-kolom | Als de flowsnelheid gereduceerd is, kan de vacuümtijd langer duren.<br><br>Of sluit de VacValve, indien gebruikt, en verwijder voorzichtig het geheel van de kolomverlenger–VacConnector–VacValve van de QIAamp Mini-kolom zonder dat er lysaat uit de kolomverlenger verloren gaat.<br><br>Verwijder de QIAamp Mini-kolom uit het vacuümverdeelstuk, plaats deze in een wasbuisje van 2 ml en draai deze op maximale snelheid tot het gehele monster het membraan is gepasseerd. Vervang het geheel van de kolomverlenger–VacConnector–VacValve met het resterende lysaat. Schakel de vacuümpomp in, open de VacValve en blijf het resterende lysaat plaatsen.<br><br>Herhaal de bovenstaande procedure als de QIAamp Mini-kolom verstopt blijft.<br><br>Er kunnen zich cryoprecipitaten hebben gevormd in plasma vanwege herhaaldelijk invriezen en ontdooien. Deze kunnen de QIAamp Mini-kolom verstopen. Gebruik geen plasma dat meerdere keren is bevroren en ontdooid.<br><br>Als er cryoprecipitaten zichtbaar zijn, centrifugeer het monster dan gedurende 5 minuten op 16.000 x g. |
| b) | Variabele elutievolumes     | Verschillende monsters kunnen van invloed zijn op het volume van het uiteindelijke eluaat. Het volume aan eluaat dat wordt verkregen, kan maximaal 5 µl minder zijn dan het elutievolume dat op de QIAamp Mini-kolom is aangebracht.  |

### Opmerkingen en suggesties

---

- c) Vacuümdruk van –800 tot –900 mbar niet bereikt
- Het vacuümverdeelstuk is niet goed gesloten. Druk het dopje op het vacuümverdeelstuk nadat het vacuüm is ingeschakeld. Controleer of de vacuümdruk wordt bereikt.
- Pakking van QIAvac-dop is versleten. Controleer de afdichting van het verdeelstuk visueel en vervang deze zo nodig.
- VacValves zijn versleten. Verwijder alle VacValves en plaats VacConnectors direct op de luer-extensies. Plaats QIAamp Mini-kolommen in de VacConnectors, sluit het dopje van de kolommen en schakel het vacuüm in. Controleer of de vacuümdruk wordt bereikt. Vervang de VacValves zo nodig.
- Aansluiting met vacuümpomp is lek. Sluit alle luer-extensies met luer-doppen en schakel de vacuümpomp in. Controleer of de vacuümdruk stabiel is nadat de pomp is ingeschakeld (en het ventiel van de Vacuum Regulator gesloten is). Verwissel zo nodig de aansluitingen tussen de pomp en het vacuümverdeelstuk.
- Als de vacuümdruk nog steeds niet wordt bereikt, vervangt u de vacuümpomp door een sterkere.

---

# Bijlage A: Aanbeveling voor scheiden en bewaren van bloedplasma

Voor gestabiliseerde bloedafnamebuisjes (zoals PAXgene ccfDNA-buisje of Streck celvrij DNA-buisje) volgt u de instructies van de fabrikant voor het scheiden en bewaren van plasma. Wij raden aan deze opslagomstandigheden te valideren in combinatie met uw specifieke vervolprocedure en doel.

Voor niet-gestabiliseerde bloedafnamebuisjes raden wij aan CEN/TS 16835-3:2015 in acht te nemen.

Voor isolatie van circulerende, celvrije nucleïnezuren uit bloedmonsters raden wij aan dit protocol te volgen, met onder meer een centrifugatiestap met hoge g-kracht om celresten te verwijderen. Dit reduceert de hoeveelheid cellulair of genomisch DNA en RNA in het monster.

1. Plaats EDTA-volbloed in BD Vacutainer®-buisjes (of andere primaire bloedbuisjes met EDTA als antistollingsmiddel) in een centrifuge die is afgekoeld tot 4 °C met uitzwaairotor en geschikte emmers.
2. Centrifugeer bloedmonsters gedurende 10 minuten op 1900 x g (3000 rpm) bij 4 °C.
3. Zuig voorzichtig plasmasupernatant af zonder de plasma-cellulaire tussenlaag te verstoren. Er kan ongeveer 4–5 ml plasma worden verkregen uit één primair bloedbuisje van 10 ml.

Opmerking: In dit stadium kan plasma worden gebruikt voor extractie van circulerende nucleïnezuren. Bij de volgende hogesnelheidscentrifugatie worden echter aanvullende celresten en besmettingen van de circulerende nucleïnezuren verwijderd door genomisch DNA en RNA dat afkomstig is uit beschadigde kernhoudende bloedcellen.

4. Afgezogen plasma wordt overgebracht naar een vers centrifugebuisje.

- 
5. Centrifugeer plasmamonsters gedurende 10 minuten op 16.000 x g (in rotor met vaste hoek) bij 4 °C.  
Zo worden aanvullende cellulaire nucleïnezuren verwijderd die aan celresten zijn bevestigd.
  6. Verwijder voorzichtig het supernatant en breng het over naar een nieuw buisje zonder de pellet te verstoren.
  7. Als er op dezelfde dag plasma wordt gebruikt voor extractie van nucleïnezuren, bewaar het dan tot de verdere verwerking bij 2–8 °C. Voor langere opslag kunnen plasma-aliquots uit gestabiliseerde en niet-gestabiliseerde bloedafnamebuisjes gedurende minstens 4 weken worden bewaard bij –20 °C (DNA als doel) of –80 °C (RNA als doel). Voordat het plasma wordt gebruikt voor extractie van circulerende nucleïnezuren, ontdooit u de plasmabuisjes bij kamertemperatuur.
  8. Optioneel: Voor het verwijderen van cryoprecipitaten centrifugeert u de plasmamonsters gedurende 5 minuten op 16.000 x g (in rotor met vaste hoek).  
Optioneel: Breng het supernatant over naar een nieuw buisje en begin vervolgens met het protocol voor extractie van circulerende nucleïnezuren.

---

# Bijlage B: Algemene opmerkingen over de verwerking van RNA

## Verwerking van RNA

Ribonucleasen (RNasen) zijn zeer stabiele en actieve enzymen die doorgaans geen cofactoren nodig hebben om te functioneren. Gebruik geen kunststof of glazen instrumenten zonder besmetting met RNasen uit te sluiten. RNasen kunnen namelijk moeilijk worden geïnactiveerd en zelfs een zeer kleine hoeveelheid is voldoende om RNA te vernietigen. Let er goed op dat er tijdens of na de zuiveringsprocedure geen RNasen onopzettelijk in het RNA-monster terechtkomen. Neem de volgende voorzorgsmaatregelen tijdens de voorbehandeling en het gebruik van wegwerpbare en niet-wegwerpbare houders en oplossingen wanneer u met RNA werkt, zodat de omgeving RNase-vrij is en blijft.

## Algemeen werk

Gebruik altijd de juiste microbiologische aseptische techniek wanneer u met RNA werkt. Op de handen en op stofdeeltjes kunnen bacteriën en schimmels aanwezig zijn; dit zijn de meest voorkomende bronnen van besmetting met RNasen. Draag altijd latex of vinyl handschoenen bij het verwerken van reagentia en RNA-monsters, om besmetting met RNasen via de huid of stof van laboratoriumapparatuur te voorkomen. Trek regelmatig schone handschoenen aan en houd alle buisjes zo veel mogelijk gesloten. Bewaar gezuiverd RNA op ijs als aliquots gepipetteerd zijn voor vervolgtoeepassingen.

## Wegwerpbare kunststof instrumenten

Het wordt aangeraden tijdens de gehele procedure gebruik te maken van steriele, RNase-vrije, wegwerpbare polypropyleen buisjes.

# Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Voor 50 bereidingen: QIAamp Mini-kolommen, kolomverlengers, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagentia, buffers en afnamebuisjes	61504
<b>Accessoires</b>		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vacuümverdeelstuk voor het verwerken van 1–24 spinkolommen: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, Luer-doppen en snelkoppelingen	19413
Vacuum Pump*	Universele vacuümpomp	84010 [VS en Canada] 84000 [Japan] 84020 [overige landen]
QIAvac Connecting System*	Systeem voor aansluiting van vacuümverdeelstuk met vacuümpomp: inclusief lade, afvalflessen, slangen, koppelingen, ventiel, meter en 24 VacValves	19419

\* Voor gebruik met vacuümprotocollen.

Zie het handboek of de gebruiksaanwijzing van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Het handboek en de gebruiksaanwijzing van QIAGEN Kits zijn verkrijgbaar via [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) of kunnen bij de technische ondersteuning van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur worden aangevraagd.

# Revisiegeschiedenis van handleiding

Datum	Wijzigingen
R4 09/2019	Wijziging van Beoogd gebruik voor celvrije nucleïnezuren van alleen menselijk plasma. Opname van het "Breeze"-protocol. Geen protocollen voor Urine en miRNA opgenomen. Veiligheidsinformatie bijgewerkt.

## Beperkte licentieovereenkomst voor QIAamp DSP Circulating NA Kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker van het product zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en dit handboek zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in de kit bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze kit te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de kit zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die verkrijgbaar zijn op [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen, en niemand anders toestaan stappen te ondernemen, die kunnen leiden tot enige handeling die hierboven als verboden is vermeld, of die dergelijke handelingen mogelijk maken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) voor de meest actuele licentievoorwaarden.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.).  
Geregistreerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, moeten altijd als wettelijk beschermd worden beschouwd, zelfs als ze niet specifiek als zodanig zijn aangegeven.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.



