

Руководство по использованию набора QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit



Версия 1



Для диагностики *in vitro*



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANY



1062689EN

— Sample to Insight —



Содержание

Назначение набора	3
Пояснения	3
Принцип и процедура	4
Предоставляемые материалы	6
Необходимые материалы, не входящие в состав набора	7
Меры предосторожности	8
Условия транспортировки и хранения реагентов	10
Условия транспортировки и хранения образцов	10
Процедура	12
Подготовка реагентов и буферов	13
Исходный материал	14
Процедура обработки, чтобы избежать перекрестного загрязнения	14
Центрифугирование	15
Обращение с колонками QIAamp Mini	15
Элюирование очищенной ДНК	16
Протокол: Выделение и очистка геномной ДНК из образцов тканей FFPE	17
Контроль качества	21
Ограничения	21
Заявленные характеристики	22
Символы	22
Контактная информация	23
Информация для заказа	24

Назначение набора

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit - это система, в которой используется технология кремнеземных мембран (технология QIAamp) для выделения и очистки геномной ДНК из биологических образцов, фиксированных в формалине, в парафине (FFPE).

Продукт предназначен для использования профессиональными пользователями, такими как технические специалисты и врачи, которые обучены методам молекулярной биологии для диагностики *in vitro* (IVD); он предназначен для подготовки проб вручную и не дает результатов испытаний, качественных или количественных.

Пояснения

Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit используется для очистки ДНК из срезов тканей FFPE. Он использует хорошо зарекомендовавшую себя технологию QIAamp DNA Micro для очистки геномной и митохондриальной ДНК из небольших объемов или размеров образцов. Набор объединяет свойства селективного связывания мембраны на основе диоксида кремния с гибкими объемами элюирования.

Условия лизиса позволяют эффективно очищать геномную ДНК из срезов тканей FFPE без необходимости инкубации в течение ночи. Инкубация при повышенной температуре после расщепления протеиназой К частично устраняет сшивание формалином высвобождаемой ДНК, потенциально улучшая выход, а также производительность ДНК в последующих анализах. Обратите внимание, что ДНК, выделенная из образцов FFPE, обычно имеет более низкую молекулярную массу, чем ДНК из свежих или замороженных образцов. Степень фрагментации зависит от типа и возраста образца и условий, используемых для фиксации.

После лизиса образцов простая процедура QIAamp DSP DNA FFPE Tissue подходит для одновременной обработки нескольких образцов.

Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности системы для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями производительности QIAGEN, описанными в руководстве.

Принцип и процедура

Процедура QIAamp DSP DNA FFPE Tissue состоит из шести этапов:

- Удаление парафина: парафин растворяется в ксилоле и удаляется
- Лизис: Образец лизируют при 56°C в денатурирующих условиях с протеиназой K
- Нагрев: инкубация при 90°C устраняет сшивание формалина
- Связывание ДНК: ДНК связывается с мембраной, а загрязняющие вещества проходят через нее
- Отмывка: остаточные загрязнения смываются
- Элюция: чистая концентрированная ДНК элюируется с мембраны

Процедура Qiaamp DNA FFPE Tissue



Рисунок 1. Процедура QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

Предоставляемые материалы

Состав набора

Набор реагентов DSP DNA FFPE Tissue Kit		(50)
Каталожный номер		60404
Количество образцов		50
	Состав	Количество
Qiaamp MinElute	Спин-колонки, каждая в пробирке для сбора образца	50
ET	Элюирующие пробирки 1,5 мл	50
LT	Лизисные пробирки 2 мл	50
WT	Отмывочные пробирки 2мл	3x50
ATL	Лизисный буфер для ткани	10 мл
AL	Лизисный буфер	12 мл
AW1	Концентрат отмывочного буфера 1	19 мл
AW2	Концентрат отмывочного буфера 2	13 мл
ATE	Буфер для элюции	12 мл
PK	Протеиназа K	1,25 мл
HB, v1	Инструкция	1

Содержит соль гуанидина. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель.

Содержит азид натрия в качестве консерванта.

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

Реагенты:

- Ксилен
- Этанол (96-100%)

Расходные материалы:

- Если принято решение не использовать пробирки, представленные в наборе, мы рекомендуем микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 или 2 мл (для этапов лизиса) и пробирки для микроцентрифугирования 1,5 мл (для этапов элюирования) (доступны в Eppendorf® [Safe-Lock: кат. № 022363204, США; кат. № 0030 120.086, Европа] или Sarstedt [кат. № 72.690]). Мы рекомендуем не содержащие ДНКаз и РНКаз пробирки конической формы с надежными крышками.
- Пробирки и наконечники для дозаторов (чтобы избежать перекрестного загрязнения, мы настоятельно рекомендуем наконечники для пипеток с аэрозольными фильтрами).

Оборудование

- Термомиксер[†], орбитальный инкубатор с подогревом, нагревательный блок или водяная баня, способная к инкубации при 56°C, 70°C и 90°C
- Микроцентрифуга[†] с ротором на 2 мл пробирки
- Вортекс

*Не используйте денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон.

[†]Чтобы обеспечить правильную обработку образцов в соответствии с процедурами QIAamp DSP DNA FFPE, мы настоятельно рекомендуем калибровать приборы в соответствии с рекомендациями производителей.

Меры предосторожности

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety , где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буферы AL и AW1 содержат гидрохлорид гуанидина, который может образовывать высокореактивные соединения в сочетании с отбеливателем.

Если жидкость, содержащая эти буферы, пролилась, очистите ее подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия.

Следующие заявления об опасности и мерах предосторожности относятся к компонентам набора DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Буфер AL



Содержит: гуанидин гидрохлорид; малеиновая кислота
Предупреждение! Может быть вредным при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Может вызвать аллергическую кожную реакцию. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и их легко сделать. Продолжайте промывать. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом. При раздражении кожи: обратиться к врачу. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Буфер ATL



Предупреждение! Вызывает легкое раздражение кожи. При раздражении кожи: обратиться к врачу.

Буфер AW1



Содержит: гидрохлорид гуанидина. Предупреждение! Вреден при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или врачу, если вы плохо себя чувствуете. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Протеиназа К



Содержит: протеиназу К. Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии или астмы или затруднение дыхания. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / брызг. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При появлении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. ПРИ ВДЫХАНИИ: Если дыхание затруднено, выведите пострадавшего на свежий воздух и держите в покое в удобном для дыхания положении. Носите респираторную защиту.

Условия транспортировки и хранения реагентов

Колонки QIAamp MinElute должны храниться при температуре 2–8°C по прибытии и могут использоваться до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Все буферы могут храниться при комнатной температуре (15–25°C) и стабильны до истечения срока годности набора. Однако восстановленные буферы AW1 и AW2 можно хранить при комнатной температуре (15–25°C) до 1 года или до истечения срока годности набора, в зависимости от того, что короче.

Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit содержит готовый к использованию раствор протеиназы К, который поставляется в специально разработанном буфере для хранения. Протеиназа К стабильна до истечения срока годности набора при хранении при комнатной температуре (15–25°C).

Условия транспортировки и хранения образцов

Следует использовать стандартные процедуры фиксации формалином и парафином. Чтобы ограничить степень фрагментации ДНК, обязательно:

- Фиксируйте образцы ткани в формалине в соответствии с лабораторным протоколом (обычно применяется 10% нейтральный забуференный формалин) как можно быстрее после хирургического удаления.

- Используйте время фиксации 14–24 часа. Ограничьте время фиксации, поскольку длительная фиксация (например, > 24 часа) может привести к более серьезной фрагментации ДНК, что приведет к плохой работе в последующих анализах).
- Тщательно обезвоживайте образцы перед фиксацией (остаточный формалин может ингибировать переваривание протеиназой K).

ДНК элюируется в буфере АТЕ и сразу же готова для использования в реакциях амплификации или для хранения (условия зависят от требований пользователя). Обратитесь к соответствующим руководствам набора для рекомендуемых условий хранения для определенных приложений QIAGEN ниже по течению.

Процедура

Важные моменты перед началом работы

- Все реагенты, поставляемые в наборе QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, предназначены для использования исключительно с другими реагентами в том же наборе. Замены реагентов недопустимы.
- После получения набора проверьте компоненты на наличие повреждений. Если упаковки или буферные бутылки повреждены, обратитесь в службу технической поддержки QIAGEN или к местному дистрибьютору. Не используйте поврежденные компоненты набора, так как их использование может привести к снижению производительности набора.
- Не используйте компоненты набора из других наборов с набором, который вы используете в настоящее время, если номера партий не совпадают.
- Избегайте микробного загрязнения реагентов набора.
- Этот набор должен использоваться только персоналом, обученным методам лабораторной диагностики *in vitro*.
- Всегда надевайте латексные или виниловые перчатки при работе с реагентами и образцами, чтобы предотвратить загрязнение поверхности кожи или пыльного лабораторного оборудования. Руки и частицы пыли могут нести бактерии и плесень, а также являются распространенными источниками загрязнения. Часто меняйте перчатки и держите пробирки закрытыми.
- Неиспользованные буферы, пробирки и остатки образца следует утилизировать в соответствии с местными процедурами.
- Если вы используете свою пластиковую посуду, на протяжении всей процедуры очистки рекомендуется использовать одноразовые полипропиленовые конические пробирки объемом 1,5–2 мл не содержащие ДНКаз / РНКаз, с надежными крышками.
- Выполните все этапы центрифугирования при комнатной температуре (15–25°C).

- Все буферы должны храниться при комнатной температуре (15–25°C), и они должны быть хорошо смешаны перед использованием.
- Установите термомиксер или орбитальный инкубатор с подогревом на 56°C для использования на шаге 11. Если термомиксер или орбитальный инкубатор с подогревом недоступен, вместо них можно использовать нагревательный блок или водяную баню.
- Если буферы AL или ATL содержат осадки, растворите их при нагревании до 70°C при осторожном перемешивании.
- Убедитесь, что буферы AW1 и AW2 были подготовлены в соответствии с инструкциями ниже.
- Процедуры контроля качества в QIAGEN включают функциональное тестирование выпуска набора для каждой отдельной партии комплекта. Поэтому не смешивайте реагенты из разных партий и не комбинируйте отдельные реагенты из разных партий.

Подготовка реагентов и буферов

■ Подготовка буфера ATL

Перед началом процедуры проверьте, не образовался ли осадок в буфере ATL. При необходимости растворите при нагревании до 70°C при осторожном перемешивании.

■ Подготовка буфера AL

Перед началом процедуры проверьте, не образовался ли осадок в буфере AL. При необходимости растворите при нагревании до 70°C при осторожном перемешивании.

■ Подготовка промывочного буфера AW1

Используя мерный цилиндр, добавьте 25 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 19 мл концентрата промывочного буфера 1 (AW1). Храните восстановленный промывочный буфер 1 (AW1) при комнатной температуре (15–25°C). Всегда смешивайте восстановленный промывочный буфер 1 (AW1), перевернув бутылочку несколько раз, прежде чем начинать процедуру.

■ Подготовка промывочного буфера AW2

Используя мерный цилиндр, добавьте 30 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 13 мл концентрата промывочного буфера 2 (AW2). Храните восстановленный промывочный буфер 2 (AW2) при комнатной температуре (15–25°C). Всегда смешивайте восстановленный промывочный буфер 2 (AW2), перевернув бутылочку несколько раз, прежде чем начинать процедуру.

Исходный материал

Исходным материалом для очистки ДНК являются нарезанные кусочки ткани FFPE (в идеале свежесрезанные). Несколько секций могут быть объединены в одной подготовке. Если у вас нет информации о характере исходного материала, мы рекомендуем начинать не более трех секций для каждого препарата.

Пользователь должен оптимизировать количество секций, толщину секций и площадь поверхности секций для любых процедур, используемых в их лаборатории. Если набор используется в сочетании с последующим приложением QIAGEN, обратитесь к соответствующему руководству за инструкциями.

Процедура обработки, чтобы избежать перекрестного загрязнения

Из-за чувствительности технологий амплификации нуклеиновых кислот при работе с колонками QIAamp MinElute необходимы следующие меры предосторожности, чтобы избежать перекрестного загрязнения между образцами:

- Не переполняйте пробирки тканью.
- Меняйте скальпели между образцами при соскобе ткани.
- Осторожно нанесите образец или раствор на колонку QIAamp MinElute без смачивания края колонки.
- Всегда меняйте наконечники. Мы рекомендуем использовать наконечники для аэрозольных барьеров.
- Всегда используйте новые пробирки при выполнении этапов отмывки.
- Убедитесь, что крышки пробирок полностью закрыты перед встряхиванием и центрифугированием.

- Убедитесь, что колонка QIAamp MinElute полностью закрыта перед центрифугированием.
- После всех этапов вортекса и этапов инкубации при 90°C коротко отцентрифугируйте микроцентрифужные пробирки для удаления капель с внутренней стороны крышек.
- Открывайте только одну колонку QIAamp MinElute за раз и старайтесь избегать образования аэрозолей.
- Всегда используйте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте, не загрязнены ли они пробным материалом. Выбросьте перчатки, если вы подозреваете, что они загрязнены.
- Открывайте только одну трубку за раз.

Центрифугирование

Колонки QIAamp MinElute подходят для большинства стандартных 1,5–2 мл микроцентрифужных пробирок. Дополнительные 2 мл пробирки доступны отдельно (QIAGEN, кат. № 19201). Центрифугирование колонок QIAamp MinElute выполняется при приблизительно 6000 x g для снижения шума центрифуги. Центрифугирование на полной скорости не улучшит выход ДНК. Однако центрифугирование колонок QIAamp MinElute на полной скорости требуется в два этапа процедуры: этап сухого центрифугирования после промывки мембран и этап элюирования. Центрифугирование на полной скорости также необходимо для удаления образца после обработки ксилолом и стадии промывания этанолом.

Все этапы центрифугирования должны проводиться при комнатной температуре (15–25°C). Низкая температура центрифугирования может привести к неоптимальной экстракции.

Обращение с колонками QIAamp Mini

- Всегда закрывайте колонки QIAamp MinElute перед помещением их в микроцентрифугу.
- Не прикасайтесь к мембране колонки QIAamp MinElute наконечником.
- Фильтраты могут содержать опасные отходы и должны быть утилизированы надлежащим образом.

- Для эффективной параллельной обработки нескольких образцов мы рекомендуем заполнить штатив пробирками, в которые после центрифугирования можно переносить колонки QIAamp MinElute. Использованные промывные пробирки можно выбросить, а новые промывочные пробирки, содержащие колонки QIAamp MinElute, можно поместить непосредственно в микроцентрифугу.

Элюирование очищенной ДНК

Для последующих применений, которые требуют небольших начальных объемов, более концентрированный элюат может повысить чувствительность анализа, но также может привести к увеличению концентрации потенциальных ингибиторов.

Увеличение объема элюирования приведет к снижению концентрации ДНК в элюате.

Объем элюата может быть примерно на 5 мкл меньше объема буфера АТЕ, нанесенного на колонку QIAamp MinElute. Например, объем элюции 20 мкл приводит к ≥ 15 мкл элюата. Объем извлеченного элюата зависит от природы образца.

Пользователь несет ответственность за оптимизацию объема элюции для любых процедур, применяемых в его лаборатории. Обратитесь к руководствам по набору для рекомендуемых объемов элюции, необходимых для конкретных приложений QIAGEN.

Выходы могут быть увеличены, если колонку инкубируют с буфером АТЕ при комнатной температуре, например, за 5 минут до центрифугирования. Элюированная ДНК может быть собрана в элюирующих пробирках объемом 1,5 мл (прилагается). Условия хранения элюированной ДНК зависят от пользовательских требований. Обратитесь к руководствам набора для рекомендуемых условий хранения для определенных приложений QIAGEN.

Протокол: Выделение и очистка геномной ДНК из образцов тканей FFPE

Процедура

1. С помощью скальпеля удалите излишки парафина с блока пробы.

2. Сделайте срезы в соответствии со стандартной лабораторной практикой. Пользователь должен оптимизировать количество секций, толщину секций и площадь поверхности секций для любых процедур, используемых в их лаборатории. Убедитесь, что прослеживаемость образцов сохраняется в течение всей процедуры.

3. Немедленно очистите ткани стерильным скальпелем в лизисной пробирке (прилагается). Убедитесь, что вся доступная ткань находится в пробирке. Добавьте к образцу 1 мл ксилола, закройте крышку и энергично встряхивайте, пока парафин не растворится (например, 10 с). Убедитесь, что пробирка полностью закрыта, чтобы избежать утечки ксилола, перекрестного загрязнения между образцами и возможного контакта с ксилолом.

Примечание. Используйте ксилол в вытяжных шкафах или других соответствующих защитных устройствах.

4. Центрифугируйте на полной скорости в течение примерно 2 мин при комнатной температуре, чтобы собрать осадок ткани. Если осадок ткани не образовался, повторите этот шаг.

Примечание: Низкая температура центрифугирования может привести к неоптимальной экстракции.

5. Удалите супернатант пипеткой. Супернатант содержит ксилол, который является опасными отходами и должен быть утилизирован в соответствии с местными правилами.

6. Добавьте 1 мл этанола (96–100%) к осадку ткани и тщательно перемешайте путем встряхивания. Этанол извлекает остаточный ксилол из образца и должен быть утилизирован соответствующим образом.

7. Центрифугируйте на полной скорости в течение примерно 2 мин при комнатной температуре. Удалите супернатант. Не удаляйте гранулы. Осторожно удалите остатки этанола с помощью тонкого наконечника пипетки. Откройте пробирку и инкубируйте при 15–40°C, пока весь остаточный этанол не испарится. Удаление остаточного этанола имеет решающее значение для успеха экстракции.

Примечание: Более низкая температура инкубации замедляет время испарения, тогда как более высокая температура может пересушить гранулу, затрудняя ее суспендирование.

8. Ресуспендируйте гранулу в 180 мкл буфера ATL. Добавьте 20 мкл протеиназы K и перемешайте встряхиванием.

Примечание: Гранулы должны быть хорошо ресуспендированы в буфере ATL, чтобы обеспечить максимальное восстановление урожая.

9. Инкубируйте при 56°C $\pm$ 3°C в течение приблизительно 1 часа (пока образец полностью не лизируется).

10. Инкубируйте при 90°C $\pm$ 5°C в течение 1 часа $\pm$ 5 мин. Инкубация при 90°C в буфере ATL частично полностью изменяет формальдегидную модификацию нуклеиновых кислот. Более короткое время инкубации или более низкие температуры инкубации могут влиять на качество и количество ДНК. Если используется только один нагревательный блок, оставьте образец при комнатной температуре после инкубации 56°C, пока нагревательный блок не достигнет 90°C.

11. Кратко центрифугируйте пробирку, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

12. Добавьте 200 мкл буфера AL к образцу и тщательно перемешайте путем встряхивания. Затем добавьте 200 мкл этанола (96–100%) и снова тщательно перемешайте путем встряхивания. Важно, чтобы образец, буфер AL и этанол смешивались немедленно и тщательно путем встряхивания или пипетирования для получения гомогенного раствора. Буфер AL и этанол могут быть предварительно смешаны и добавлены вместе за один шаг, чтобы сэкономить время при обработке нескольких образцов. Белый осадок может образовываться при добавлении буфера

AL и этанола. Этот осадок не мешает процедуре QIAamp. Всегда используйте свежую смесь и выбрасывайте ее сразу после использования.

13. Кратко центрифугируйте пробирку, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

14. Осторожно перенесите весь лизат в колонку QIAamp MinElute (в промывной пробирке объемом 2 мл), закройте крышку и центрифугируйте при приблизительно 6000 x g в течение ≥ 1 мин. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую промывочную пробирку объемом 2 мл (прилагается) и выбросьте промывочную пробирку. Если лизат не прошел полностью через мембрану после центрифугирования, снова центрифугируйте на более высокой скорости, пока колонка QIAamp MinElute не опустеет.

15. Осторожно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл восстановленного буфера AW1. Закройте крышку и центрифугу примерно при 6000 x g в течение ≥ 1 мин. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую промывочную пробирку объемом 2 мл и выбросьте промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

16. Осторожно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл восстановленного буфера AW2. Закройте крышку и центрифугируйте примерно при 6000 x g в течение ≥ 1 мин. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую пробирку для промывки объемом 2 мл и выбросьте пробирку, содержащую фильтрат. Следует избегать контакта между колонкой QIAamp MinElute и проточной частью. Обязательно сбалансируйте ротор центрифуги. Некоторые роторы центрифуги могут вибрировать при замедлении, в результате чего проточный канал, содержащий этанол, вступает в контакт с колонкой QIAamp MinElute. Соблюдайте осторожность при снятии колонки QIAamp MinElute и промывочной пробирки с ротора, чтобы фильтрат не соприкасался с колонкой QIAamp MinElute.

17. Центрифугируйте на полной скорости (примерно 20000 x g) в течение примерно 3 минут, чтобы высушить мембрану. Поступление этанола в элюат может мешать некоторым последующим применениям.

18. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую элюирующую пробирку объемом 1,5 мл (прилагается) и выбросьте промывочную пробирку, содержащую фильтрат. Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp MinElute и нанесите 20–200 мкл буфера АТЕ на центр мембраны.

ВАЖНО: При использовании небольших объемов элюции (<50 мкл), нанесите буфер АТЕ на центр мембраны, чтобы обеспечить полное элюирование связанной ДНК. Колонки QIAamp MinElute обеспечивают гибкость в выборе объема элюции. Выберите объем в соответствии с требованиями нижестоящего приложения. Объем элюата будет примерно на 5 мкл меньше объема элюирующего раствора, нанесенного на колонку.

19. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре (15–25°C) не менее 1 мин. Центрифугируйте на полной скорости (около 20000 x g) в течение ≥1 мин. Инкубация колонки QIAamp MinElute с буфером АТЕ, в течение приблизительно 5 минут при комнатной температуре перед центрифугированием может увеличить выход ДНК.

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия наборов QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit проверяется на соответствие заранее установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

Эффективность набора была установлена с использованием фиксированных формалином, залитых парафином тканей (тканей FFPE) для выделения геномной ДНК.

Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности системы для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями по оценке эффективности QIAGEN.

Чтобы свести к минимуму риск негативного влияния на результаты диагностики, следует использовать соответствующие средства контроля при последующих применениях.

Любые результаты диагностики должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими или лабораторными данными.

Используя QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, РНК может быть со-очищена с ДНК, если она присутствует в образце.

Заявленные характеристики

См. www.qiagen.com/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE для получения характеристик производительности набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Символы

Символы в следующей таблице включают символы, используемые в этих инструкциях по применению.

	Содержит количество реагентов для N тестов
	Использовать до
	Для диагностики <i>in vitro</i>
	Каталожный номер
	Номер лота
	Номер материала
	Компоненты
	Количество
	Версия и номер инструкции
	Объем
	Температурные ограничения
	Производитель
	Только для использования с

EC	REP	Авторизованный представитель в Европе
		См. инструкцию пользователя
CONT		Содержит
WELL		Номер ячейки
REAG	CART	Картридж с реагентами
ELU	BUF	Буфер элюции
IPA		Изопропанол
PROTK		Протеиназа К
GTC		Гуанидин тиоционат
GuHCL		Гуанидин гидрохлорид
EtOH		Этанол
MALEIC ACID		Малеиновая кислота
BRIJ 58		BRIJ 58
LiCl		Хлорид лития
GTIN		Global Trade Item Number
		Внимание
		Острый

Контактная информация

Для получения технической помощи и получения дополнительной информации, пожалуйста, посетите наш Центр технической поддержки по адресу www.qiagen.com/Support, позвоните по номеру 00800-22-44-6000 или обратитесь в один из отделов технического обслуживания QIAGEN или к местным дистрибьюторам.

Информация для заказа

Продукт	Описание	Cat.no
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Для 50 выделений ДНК: 50 колонок QIAamp MinElute®, протеиназа К, буферы, промывочные пробирки (2 мл), пробирки для элюции (1,5 мл), пробирки для лизиса (2 мл)	60404

Справочники и руководства пользователя по наборам QIAGEN доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены у технической службы QIAGEN или у местного дистрибьютора.

Заказ www.qiagen.com/shop

Техническая поддержка support.qiagen.com

Веб-сайт www.qiagen.com

Руководство по использованию набора QIAamp DSP Virus Kit

QIAamp DSP Virus Kit - это система, использующая технологию QIAamp для выделения и очистки вирусных нуклеиновых кислот из образцов плазмы или сыворотки человека

Для диагностики *in vitro*

IVD

CE

REF

i



R3 MAT

60704

1114514

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

1114514

— Sample to Insight —



Содержание

Состав набора	3
Символы	4
Хранение	6
Контроль качества	6
Назначение	7
Ограничения	7
Меры предосторожности	8
Введение	10
Принцип и процедура	10
Необходимые материалы, не входящие в состав набора	15
Важно	16
Подготовка РНК	16
Хранение образцов	17
Подготовка реагентов и буферов	17
Элюция вирусных нуклеиновых кислот	20
Выход и качество вирусных нуклеиновых кислот	21
Настройка вакуумной системы QIAvac 24 Plus	22
Протокол: Выделение и очистка вирусных нуклеиновых кислот из образцов сыворотки или плазмы	24
История пересмотра руководства	27

Состав набора

Набор реагентов Qiaamp DSP Virus Kit		(50)
Каталожный номер		60704
Количество образцов		50
	Состав	Количество
Qiaamp MinElute	Спин-колонок, каждая в пробирке для сбора образца	50
EXT	Расширители колонок (3 мл)	50
VC	Вак-коннекторы	50
ET	Элюирующие пробирки 1,5 мл	50
LT	Лизисные пробирки 2 мл	50
WT	Отмывочные пробирки 2мл	50
Carrier	Носитель РНК (красные крышки)	310
AL	Лизисный буфер*	33 мл
AW1	Концентрат отмывочного буфера 1*	19 мл
AW2	Концентрат отмывочного буфера 2†	13 мл
AVE	Буфер для элюции†	4x2 мл
PS	Растворитель протеазы†	4,4 мл
QP	Протеаза	1 пробирка

*Содержит гуанидин гидрохлорид. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель.

† Содержит азид натрия в качестве консерванта.

‡ Объем ресуспендирования 4,4 мл.

Символы



Количество реагентов достаточно для 50 выделений

См. руководство пользователя

Использовать до

Для диагностики in vitro

Каталожный номер

Номер лота

Материал

Компоненты

Объем

Температурные границы

По прибытии

Производитель

Важные заметки

Заменить перчатки

Открыть при доставке

Торговый номер

Написать текущую дату после добавления этанола

Добавить

Содержит

Лиофилизированный

Восстановить в

Этанол

GuHCl

MALEIC ACID

SUBT



Гуанидин гидрохлорид

Малеиновая кислота

Субтилизин

Приводит к

Хранение

Колонки QIAamp MinElute следует хранить при температуре 2–8°C.

Все буферы можно хранить при комнатной температуре (15–25°C).

Лиофилизированный РНК-носитель может храниться при комнатной температуре до истечения срока годности. РНК-носитель может быть растворен только в буфере для элюции (AVE); растворенный РНК-носитель следует немедленно добавить в буфер лизиса (AL). Этот раствор должен быть приготовлен свежим и стабильным при 2–8°C в течение до 48 часов. Неиспользованные части РНК-носителя, растворенные в буфере для элюции (AVE), следует заморозить в аликвотах при -20°C.

Лиофилизированную протеазу QIAGEN (QP) можно хранить при комнатной температуре до истечения срока годности без снижения производительности. Восстановленная протеаза QIAGEN (QP) стабильна до 1 года при хранении при 2–8°C, но только до истечения срока годности. Восстановленный промывочный буфер 1 (AW1) и восстановленный промывочный буфер 2 (AW2) стабильны до 1 года при хранении при комнатной температуре, но только до истечения срока годности.

Контроль качества

В соответствии с сертифицированной системой общего управления качеством QIAGEN каждая партия комплекта QIAamp DSP Virus Kit проверяется на соответствие заранее установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Назначение

QIAamp DSP Virus Kit - это система, использующая технологию QIAamp для выделения и очистки вирусных нуклеиновых кислот из образцов плазмы или сыворотки человека для диагностики *in vitro*. Любые диагностические результаты, полученные с использованием процедуры подготовки образца в сочетании с любым последующим диагностическим анализом, следует интерпретировать с учетом других клинических или лабораторных результатов.

Продукт предназначен для использования профессиональными пользователями, такими как техники, врачи научные сотрудники, обученные молекулярно-биологическим методам. Он предназначен для использования с любым последующим применением, использующим ферментативную амплификацию или другую ферментативную модификацию ДНК или РНК с последующим обнаружением сигнала амплификации. Выделенные и очищенные вирусные нуклеиновые кислоты можно использовать для качественного (например, скрининга крови), а также количественного (например, мониторинга вирусной нагрузки) диагностического анализа.

Чтобы свести к минимуму нарушения результатов диагностики, продукт предназначен для использования с внутренним контролем, а также с положительным и отрицательным контролем в течение всего процесса подготовки образца, а также амплификации и обнаружения образца в соответствии с используемым последующим анализом.

Продукт предназначен для использования с вакуумной системой QIAvac 24 Plus или эквивалентной вакуумной системой.

Ограничения

Набор не предназначен для использования с кровью, тканями, костным мозгом или культивируемыми клетками. Набор также не предназначен для выделения и очистки бактериальных, грибковых или паразитных нуклеиновых кислот. Эффективность набора для выделения и очистки вирусных нуклеиновых кислот от других бесклеточных жидкостей организма, таких как моча и СМЖ, не была оценена.

Меры предосторожности

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety , где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буфер для лизиса (AL) и промывочный буфер 1 (AW1) содержат гидрохлорид гуанидина, который может образовывать высокореактивные соединения в сочетании с отбеливателем. Если жидкость, содержащая эти буферы, пролилась, очистите ее подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия. Если буферные бутылки повреждены или протекают, при выбрасывании бутылок надевайте перчатки и защитные очки, чтобы избежать травм.

QIAGEN не проверял жидкие отходы, генерируемые QIAamp DSP Virus для остаточных инфекционных материалов. Загрязнение жидких отходов остаточными инфекционными материалами маловероятно, но не может быть полностью исключено. Таким образом, жидкие отходы должны считаться инфекционными и должны обрабатываться и выбрасываться в соответствии с местными правилами техники безопасности.

Следующие утверждения касаются компонентов набора

Буфер AL



Содержит: гуанидин гидрохлорид; малеиновая кислота
Предупреждение! Может быть вредным при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Может вызывать аллергическую кожную реакцию. Вызывает серьезное раздражение глаз. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Буфер AW1



Содержит: гидрохлорид гуанидина. Предупреждение! Вреден при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Протеиназа QIAGEN



Содержит: субтилизин. Опасность! Вред при проглатывании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное повреждение глаз. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии или астмы или затруднение дыхания. Может вызвать раздражение дыхательных путей. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / брызг. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица. Носить респираторную защиту. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжать промывать. В случае воздействия или беспокойства: немедленно позвонить врачу. Вывести пострадавшего на свежий воздух и держать в покое в удобном для дыхания положении.

Введение

В QIAamp DSP Virus Kit используется хорошо отработанная технология для одновременного выделения и очистки вирусной ДНК и РНК. Процедура QIAamp DSP Virus сочетает в себе свойства селективного связывания мембраны на основе диоксида кремния с минимальными объемами элюирования 20 или 60 мкл.

Процедура подходит для использования с плазмой или сывороткой; либо может содержать цитрат или ЭДТА. Образцы могут быть свежими, лиофилизированными или замороженными при условии, что они не были заморожены и оттаивали не раз. Процедура может быть использована для выделения вирусной РНК и ДНК из широкого спектра вирусов РНК и ДНК. Процедура предназначена для предотвращения перекрестного загрязнения между образцами и безопасного обращения с потенциально инфекционными образцами. Процедура отлично подходит для одновременной обработки нескольких образцов. Вирусные нуклеиновые кислоты элюируют в буфере для элюции (AVE), готовом для использования в реакциях амплификации или хранения при -20°C.

Принцип и процедура

Процедура QIAamp DSP Virus включает 4 этапа:

- Лизис вирусных частиц в пробе
- Связывание вирусных нуклеиновых кислот с мембраной колонки QIAamp MinElute
- Отмывка мембраны
- Элюирование вирусных нуклеиновых кислот из мембраны

Процедура проводится с использованием колонок QIAamp MinElute на вакуумном коллекторе.

Лизис вирусных частиц

Образцы лизируют в денатурирующих условиях при повышенных температурах. Лизис проводят в присутствии протеазы QIAGEN (QP) и буфера для лизиса (AL), которые вместе обеспечивают инактивацию РНКаз.

Связывание нуклеиновых кислот с мембраной колонки QIAamp MinElute

Чтобы оптимизировать связывание вирусной ДНК и РНК с мембраной колонки QIAamp MinElute, в лизаты сначала добавляют этанол. Каждый лизат затем наносится на колонку QIAamp MinElute, и вирусные нуклеиновые кислоты адсорбируются на мембране на основе диоксида кремния при протягивании лизата через вакуум.

Удаление контаминантов

В то время как вирусные нуклеиновые кислоты остаются связанными с мембраной колонки QIAamp MinElute, контаминанты эффективно вымываются с использованием сначала промывочного буфера 1 (AW1), затем промывочного буфера 2 (AW2), а затем этанола.

Элюция чистых нуклеиновых кислот

Вирусные нуклеиновые кислоты элюируют с мембраны QIAamp MinElute с использованием буфера для элюции (AVE). Колонки QIAamp MinElute позволяют элюировать объемы 20 мкл или 60 мкл.

Заявленные характеристики

Линейный диапазон процедуры QIAamp DSP Virus был определен для РНК ВИЧ и ДНК HBV в нескольких последующих диагностических анализах.

Таблица 1 Диагностические анализы

Назначение	Набор
ПЦР-РВ РНК ВИЧ	TaqMan® assay and cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR® Test
ПЦР-РВ ДНК ВГЧ	TaqMan assay and cobas AMPLICOR HBV MONITOR® Test

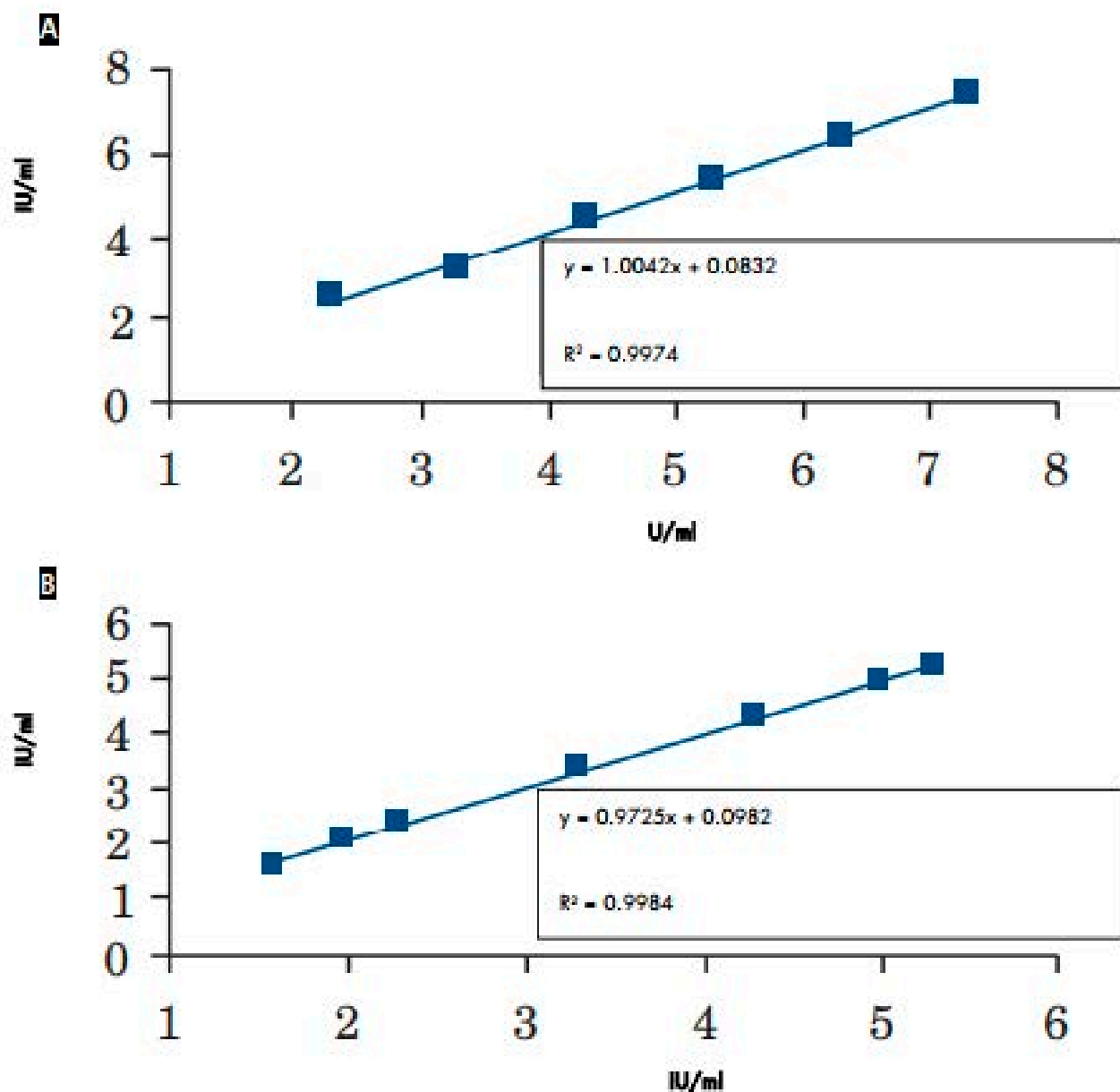


Рисунок 1. Линейный диапазон вирусной процедуры QIAamp DSP с использованием TaqMan. Линейный диапазон процедуры QIAamp DSP Virus при объеме элюции 60 мкл определяли с использованием TaqMan для РНК ВИЧ и ДНК В HBV.

Предел обнаружения (DL) и предел количественного определения (QL), в соответствии с руководством ICH 2QA и 2QB, были определены для процедуры QIAamp DSP Virus (с исходным объемом образца 500 мкл и объемом элюции 20 мкл и 60 мкл) с использованием различных последующих диагностических анализов.

Таблица 2. Предел обнаружения вируса

Набор	Объем элюции	95% интервал
artus® RealArt™ HBV DNA	20 µl	2.31 IU/ml (n=240)
artus RealArt HCV RNA	20 µl	24.31 IU/ml (n=192)
AMPLICOR manual HIV RNA	60 µl	90.92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4.73 IU/ml (n=192)

Таблица 3. Предел количественного обнаружения вируса

Набор	QL	CV
TaqMan HBV DNA	5.7 IU/ml	< 70% (n=88)
TaqMan HIV RNA	52 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IU/ml	< 60% (n=88)
cobas AMPLICOR HCV RNA®	700 IU/ml	< 60% (n=66)

Процедура экстракции

Образец

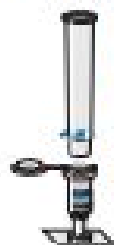


Лизис



Связывание

Вакуум



Отмывка (AW1)
Удалите EXT
перед вакуумом

Вакуум



Отмывка (AW2)

Вакуум



Отмывка (этанол)

Вакуум



Открутка (сухая)



Элюция



Чистые вирусные НК

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

- Этанол (96–100%)
- Дозаторы и наконечники пипеток (настоятельно рекомендуем использовать наконечники с аэрозольными барьерами)
- Одноразовые перчатки
- Нагревательный блок для лизиса образцов при 56°C (мы рекомендуем Eppendorf® Thermomixer comfort с термоблоком для 1,5 мл микропробирок)
- Микроцентрифуга
- Мерный цилиндр (50 мл)
- Вортекс
- Вакуумная система QIAvac 24 Plus (QIAvac 24 Plus, кат.№ 19413, Соединительная система QIAvac, Кат.№ 19419 и вакуумный насос, Кат.№ 84020) или эквивалентная общая лабораторная вакуумная система

Важно

Важные моменты перед началом работы

- После получения набора проверьте компоненты на наличие повреждений.
- Не используйте поврежденные компоненты набора, так как это может привести к снижению производительности набора.
- Используйте материалы, свободные от РНКаз.
- Всегда меняйте наконечники. Чтобы свести к минимуму перекрестное загрязнение, мы рекомендуем использовать наконечники с фильтрами.
- Все этапы центрифугирования проводятся при комнатной температуре (15–25°C).
- Всегда используйте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте, чтобы они не были загрязнены материалом образца.
- Чтобы минимизировать перекрестное загрязнение, открывайте только одну пробирку за раз.
- Не используйте компоненты набора из других наборов с набором, который вы используете в настоящее время, если номера партий не совпадают.
- Избегайте микробного загрязнения реагентов набора.
- Чтобы свести к минимуму риск заражения потенциально инфекционными материалами, мы рекомендуем работать в условиях ламинарного воздушного потока до этапа лизиса образца.
- Этот набор предназначен для персонала, обученного лабораторной практике диагностики *in vitro*.
- Процедура содержит инструкции для обработки одного образца плазмы или сыворотки. Однако в вакуумной системе QIAvac 24 Plus можно обрабатывать до 24 образцов одновременно.

Подготовка РНК

При подготовке вирусной РНК работайте быстро во время ручных шагов процедуры.

Буфер элюции (AVE) содержит азид натрия, антимикробный агент, который предотвращает рост РНКаз-продуцирующих организмов. Однако, поскольку этот буфер не содержит каких-либо химических веществ, разрушающих РНКазу, он не будет активно ингибировать РНКазы, введенные при неправильном обращении. Следует соблюдать крайнюю осторожность, чтобы избежать загрязнения РНКазой при работе с буфером для элюции (AVE).

Хранение образцов

После сбора и центрифугирования плазму или сыворотку можно хранить при температуре 2–8°C до 6 часов. Для длительного хранения рекомендуется замораживание при -20°C или -80°C в аликвотах. Замороженные образцы плазмы или сыворотки нельзя размораживать более одного раза. Повторное замораживание-оттаивание приводит к денатурации и осаждению белков, что приводит к снижению титров вируса и, следовательно, снижению выхода вирусных нуклеиновых кислот. Кроме того, криопреципитаты, образующиеся во время замораживания-оттаивания, засоряют мембрану колонки QIAamp MinElute. Если криопреципитаты видны, их следует гранулировать центрифугированием при приблизительно 6800 × g в течение 3 минут. Очищенный супернатант следует аспирировать и обрабатывать немедленно, не нарушая осадок.

Подготовка реагентов и буферов

Приготовление протеазы QIAGEN

Добавьте все содержимое флакона, содержащего 4,4 мл протеазного растворителя (PS), во флакон с лиофилизированной протеазой QIAGEN (QP) и тщательно перемешайте. Чтобы избежать пенообразования, смешайте, перевернув флакон несколько раз. Убедитесь, что протеаза QIAGEN (QP) полностью растворена. Не добавляйте протеазу QIAGEN (QP) непосредственно в буфер лизиса (AL).

Добавление РНК-носителя и внутреннего контроля в лизирующий буфер

Во-первых, РНК-носитель усиливает связывание вирусных нуклеиновых кислот с мембраной колонки QIAamp MinElute, особенно если в образце очень мало молекул-мишеней. Во-вторых, добавление больших количеств РНК-носителя

снижает вероятность деградации вирусной РНК в редком случае, когда молекулы РНКазы не денатурируются хаотропными солями и детергентом в буфере лизиса (AL). Если РНК-носитель не добавляется в буфер лизиса (AL), это может привести к снижению восстановления вирусной РНК или ДНК. РНК-носитель также может быть включена в некоторые реагенты внутреннего контроля коммерческих последующих анализов. В этих случаях, пожалуйста, обратитесь к соответствующим инструкциям по использованию от производителя последующего анализа. Настоятельно рекомендуется использовать внутренний контроль при использовании QIAamp DSP Virus Kit в сочетании с диагностическими тест-системами. Внутреннюю контрольную РНК или ДНК и восстановленный РНК-носитель следует добавить в буфер лизиса (AL) и тщательно перемешать, переворачивая пробирку 10 раз. Чтобы избежать пенообразования, не встряхивайте.

Обратитесь к инструкциям производителя, чтобы определить оптимальную концентрацию внутреннего контроля. Использование концентрации, отличной от рекомендуемой, может привести к неверным результатам. При расчете правильного количества внутреннего контроля для использования, принять во внимание начальный объем образца и объем элюции. Помните, что QIAamp DSP Virus Kit использует начальный объем образца 500 мкл.

Чтобы приготовить раствор РНК-носителя, добавьте 310 мкл буфера для элюции (AVE) в пробирку, содержащую 310 мкг лиофилизированной РНК-носителя, чтобы получить раствор 1 мкг / мкл. Тщательно растворите РНК-носитель, разделите его на аликвоты удобного размера и храните при -20°C. Не замораживайте-размораживайте аликвоты РНК-носителя более 2 раз.

Обратите внимание, что РНК-носитель не растворяется в буфере лизиса (AL). Сначала его необходимо растворить в буфере для элюции (AVE), а затем добавить в буфер для лизиса (AL). Убедитесь, что РНК-носитель полностью растворен в нужном объеме буфера для элюции (AVE), прежде чем смешивать его с буфером для лизиса (AL).

Рассчитайте объем смеси лизирующего буфера (AL) / РНК-носителя, необходимой для каждой партии образцов, выбрав количество образцов для одновременной обработки из таблицы 4. Объемы рассчитываются с использованием следующего расчета образцов:

$n \times 0,55 \text{ мл} = y \text{ мл}$

$y \text{ мл} \times 11,2 \text{ мкл} / \text{мл} = g \text{ мкл}$

где: n = количество выборок для одновременной обработки

y = расчетный объем буфера для лизиса (AL)

z = объем несущей РНК / буфера для элюции (AVE) для добавления в буфер лизиса (AL)

Таблица 4.-Объемы лизисного буфера (AL) и РНК-носителя / буфера для элюции (AVE), необходимые для процедуры QIAamp DSP Virus

Кол-во образцов	Объем А.Л (мл)	Объем носителя РНК/AVE (мкл)	Кол-во образцов	Объем А.Л (мл)	Объем носителя РНК/AVE (мкл)
1	0.55	6.2	13	7.15	80.0
2	1.10	12.3	14	7.70	86.0
3	1.65	18.5	15	8.25	92.4
4	2.20	24.6	16	8.80	98.6
5	2.75	30.8	17	9.35	104.7
6	3.30	37.0	18	9.90	110.9
7	3.85	43.1	19	10.45	117.0
8	4.40	49.3	20	11.00	123.2
9	4.95	55.0	21	11.55	129.4
10	5.50	61.6	22	12.10	135.5
11	6.05	67.8	23	12.65	141.7
12	6.60	73.9	24	13.20	147.8

Подготовка промывочного буфера 1 (AW1)

Используя мерный цилиндр, добавьте 25 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 19 мл концентрата промывочного буфера 1 (AW1). Храните восстановленный промывочный буфер 1 (AW1) при комнатной температуре (15–25°C). Всегда смешивайте восстановленный промывочный буфер 1 (AW1), перевернув бутылочку несколько раз, прежде чем начинать процедуру.

Подготовка промывочного буфера 2 (AW2)

Используя мерный цилиндр, добавьте 30 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 13 мл концентрата промывочного буфера 2 (AW2). Храните восстановленный промывочный буфер 2 (AW2) при комнатной температуре (15–25°C). Всегда смешивайте восстановленный промывочный буфер 2 (AW2), перевернув бутылочку несколько раз, прежде чем начинать процедуру.

Подготовка буфера для элюции (AVE)

Четыре пробирки буфера для элюции (AVE) входят в комплект. Будьте осторожны, чтобы не загрязнить буфер РНКазы. При выполнении 4 или менее процедур очистки с использованием одного набора мы рекомендуем выбросить пробирку с буфером для элюции (AVE) в конце каждой процедуры.

Элюция вирусных нуклеиновых кислот

Для последующих применений, которые требуют небольших начальных объемов (например, ПЦР и ОТ-ПЦР), использование вирусных нуклеиновых кислот, элюированных в 20 мкл буфера для элюции (AVE), может повысить чувствительность анализа.

Объем вирусных нуклеиновых кислот, элюируемых из колонки QIAamp MinElute, может быть на 5 мкл меньше объема буфера для элюции (AVE), наносимого на колонку. Например, элюирование вирусных нуклеиновых кислот с помощью 60 мкл буфера для элюирования (AVE) приводит к элюату приблизительно 55 мкл, в то время как при элюировании 20 мкл получается приблизительно 15 мкл элюата.

Объем извлеченного элюата зависит от природы образца. Если объем извлеченного элюата слишком мал для последующего анализа, увеличьте объем, добавив больше буфера для элюции (AVE).

Элюированные вирусные нуклеиновые кислоты собирают в пробирки для элюции (ET). При хранении вирусных нуклеиновых кислот до 24 часов мы рекомендуем хранить при 2–8°C.

Выход и качество вирусных нуклеиновых кислот

Выход и качество выделенных вирусных нуклеиновых кислот подходят для всех типов последующих процедур детектирования в молекулярной диагностике. Диагностические исследования должны проводиться в соответствии с инструкциями производителя.

Настройка вакуумной системы QIAvac 24 Plus

Убедитесь, что вы правильно настроили удлинитель колонки (EXT), колонку QIAamp MinElute, VacConnector (VC) и VacValve (см. Рис. 3).

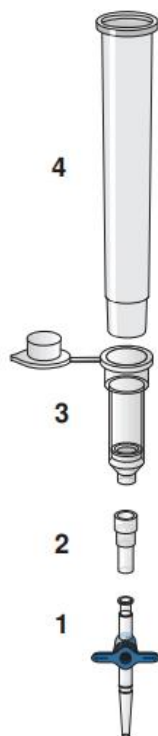


Рисунок 3. Сборка компонентов QIAamp DSP для вакуумной обработки образцов.

- 1: VacValve (поставляется с вакуумной системой)
- 2: VacConnector (VC)
- 3: QIAamp MinElute Column
- 4: удлинитель колонны (EXT)

При использовании вакуумной процедуры с вакуумной системой QIAvac 24 Plus мы рекомендуем маркировать лизисные пробирки (LT), элюирующие пробирки (ET) и спиновые колонки QIAamp Mini согласно схеме на рис. 4.

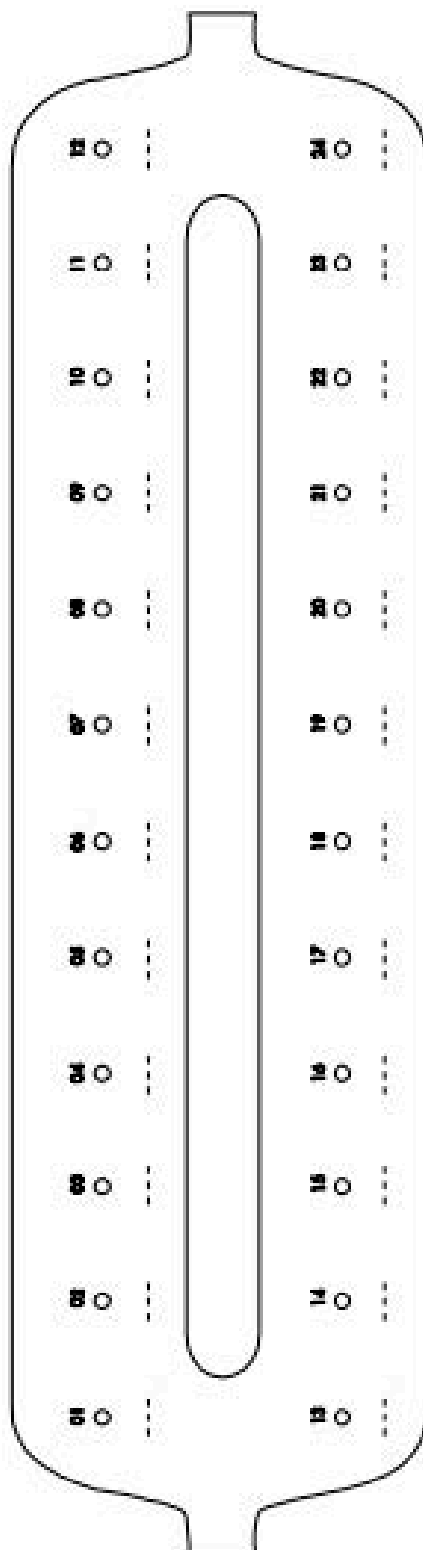


Рисунок 4. Схема маркировки для лизисных пробирок (LT), элюирующих пробирок (ET) и спиновых колонок QIAamp Mini для использования на QIAvac 24 Plus.

Протокол: Выделение и очистка вирусных нуклеиновых кислот из образцов сыворотки или плазмы

Для выделения и очистки вирусных нуклеиновых кислот из 500 мкл плазмы и сыворотки, обработанных ЭДТА или цитратом.

Перед началом работы:

- Доведите образцы до комнатной температуры (15–25°C) и перемешайте.
- Добавьте РНК-носитель, восстановленный в буфере для элюции (AVE) или для внутреннего контроля, в буфер для лизиса (AL), в соответствии с инструкциями.
- Убедитесь, что промывочные буферы AW1 и AW2, протеаза QIAGEN (QP) были подготовлены в соответствии с инструкциями.
- Доведите буферы до комнатной температуры (15–25°C).
- Установите нагревательный блок на 56°C для использования в шаге 4 и 17.
- Чтобы свести к минимуму перекрестное загрязнение, вставьте VacConnector (VC) в каждый адаптер Luer вакуумной системы.
- Убедитесь, что емкость для отходов вакуумной системы пуста и все муфты подключены правильно.
- Подробную информацию о работе вакуумной системы, особенно о техническом обслуживании, см. В прилагаемом руководстве.

Процедура

1. Внесите 75 мкл протеазы QIAGEN (QP) в пробирку для лизиса (LT).
Проверьте срок годности восстановленной протеазы перед использованием.
2. Добавьте 500 мкл плазмы или сыворотки в пробирку для лизиса (LT).
3. Добавьте 500 мкл буфера для лизиса (AL) (содержащего 11,2 мкг / мл РНК-носителя) в пробирку для лизиса (LT), закройте крышку и перемешайте на вортексе в течение 15 секунд.

Для обеспечения эффективного лизиса важно, чтобы образец и буфер для лизиса (AL) тщательно перемешивались для получения гомогенного раствора.

Буфер для лизиса (AL) содержит внутренний контроль. Поскольку буфер для лизиса (AL) имеет высокую вязкость, обязательно добавьте правильный объем буфера для лизиса (AL).

Не добавляйте протеазу QIAGEN (QP) непосредственно в буфер лизиса (AL).

4. Инкубируйте при 56°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) в течение 15 минут (± 1 мин).
5. Центрифугируйте пробирку для лизиса (LT) в течение ≥ 5 секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.
6. **Поменяйте перчатки** и осторожно откройте лизирующую пробирку (LT).
7. Добавьте 600 мкл этанола (96–100%) в пробирку для лизиса (LT), закройте крышку и тщательно перемешайте на вортексе в течение ≥ 15 секунд. Инкубируйте в течение 5 минут (± 1 минута) при комнатной температуре (15–25°C).
8. Центрифугируйте пробирку для лизиса (LT) в течение ≥ 5 секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.
9. Вставьте колонку QIAamp MinElute в VacConnector (VC) в вакуумной системе (см. Рисунок 3, страница 24). Вставьте удлинитель колонки (EXT) в открытую колонку QIAamp MinElute. Сохраните промывочную пробирку (WT) для сухого отжима на шаге 16.
10. **Поменяйте перчатки** и открывайте только одну пробирку за раз.
11. Осторожно нанесите весь лизат, полученный на этапе 7, в удлинитель колонки (EXT) колонки QIAamp MinElute.
12. Включите вакуум. После прохождения лизата через колонку QIAamp MinElute откройте клапан вакуумной системы и выпустите вакуум. Если обрабатывается несколько колонок QIAamp MinElute одновременно, мы рекомендуем закрыть VacValve каждой колонки после прохождения лизата, чтобы сократить продолжительность этого этапа вакуума. Если лизат не прошел полностью через мембрану через 15 минут,

выбросьте колонку QIAamp MinElute и повторите процедуру с новым образцом. Клапан вакуумной системы следует использовать для быстрого сброса давления вакуума.

13. Нанесите 600 мкл промывочного буфера 1 (AW1) в колонку QIAamp MinElute. Осторожно снимите и выбросьте удлинитель колонки (EXT) и закройте клапан вакуумной системы. После прохождения промывочного буфера 1 (AW1) через колонку QIAamp MinElute откройте клапан, и выпустите вакуум. Чтобы избежать перекрестного загрязнения, убедитесь, что снятые удлинители колонок (EXT) не проходят через соседние колонки QIAamp MinElute.
14. Нанесите 750 мкл промывочного буфера 2 (AW2) в колонку QIAamp MinElute. Оставьте крышку колонки открытой и закройте клапан вакуумной системы. После прохождения промывочного буфера 2 (AW2) через колонку QIAamp MinElute откройте клапан и выпустите вакуум.
15. Нанесите 750 мкл этанола (96–100%) в колонку QIAamp MinElute. Оставьте крышку колонки открытой и закройте клапан вакуумной системы. После прохождения этанола через колонку QIAamp MinElute откройте клапан и выпустите вакуум.
16. Закройте крышку колонки QIAamp MinElute, снимите ее с вакуумной системы и выбросьте VacConnector (VC). Поместите колонку QIAamp MinElute в промывочную пробирку (WT), сохраненную на шаге 9, и центрифугируйте на полной скорости (примерно 20000 x g или 14000 об / мин) в течение 1 минуты, чтобы полностью высушить мембрану. Выбросьте промывочную пробирку (WT), содержащую фильтрат.
17. Поместите колонку QIAamp MinElute в новую промывочную пробирку (WT) и инкубируйте с открытой крышкой при 56°C в течение 3 минут, чтобы испарить оставшуюся жидкость.
18. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую пробирку для элюции (ET) и выбросьте промывочную пробирку (WT). Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp MinElute и нанесите 20 мкл или 60 мкл буфера для элюции (AVE) (в зависимости от последующего анализа) в центр мембраны. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре

(15–25°C) в течение ≥ 3 минут. Центрифугируйте на полной скорости (примерно 20000 x g, или 14000 об / мин) в течение 1 минуты, чтобы элюировать вирусные нуклеиновые кислоты. Следуйте процедуре обслуживания вакуумной системы после выполнения этого протокола (см. Руководство, поставляемое с вакуумной системой, для получения более подробной информации).

Актуальную информацию о лицензировании и отказ от ответственности для конкретного продукта см. в соответствующем справочнике или руководстве пользователя комплекта QIAGEN. Справочники и руководства пользователя по наборам QIAGEN доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены у технической службы QIAGEN или у местного дистрибьютора.

Заказ www.qiagen.com/shop

Техническая поддержка support.qiagen.com

Веб-сайт www.qiagen.com

Руководство по использованию набора QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit

Версия 2



Для диагностики *in vitro*



61104



1071108EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

Tel: +49-2103-29-0

R2



1071108EN



QIAGEN технологии пробоподготовки и анализа

QIAGEN является ведущим поставщиком инновационных технологий проб и анализа, позволяющих работать с содержимым любого биологического образца. Наши передовые, высококачественные продукты и услуги гарантируют успех от образца к результату.

QIAGEN устанавливает стандарты в таких сферах, как:

- Очистка ДНК, РНК и белков
- Анализ нуклеиновых кислот и белков
- исследование микроРНК и РНК
- Автоматизация проб и технологий анализа

Наша миссия - помочь вам добиться выдающихся успехов и прорывов. Для получения дополнительной информации посетите www.qiagen.com.

Содержание

Назначение набора	4
Пояснения	4
Автоматизация выделения	6
Предоставляемые материалы	8
Необходимые материалы, не входящие в состав набора	9
Меры предосторожности	10
Условия транспортировки и хранения реагентов	12
Условия транспортировки и хранения образцов	12
Подготовка реагентов и буферов	14
Обращение с колонками QIAamp Mini	15
Протокол: Выделение и очистка геномной ДНК из образцов крови с использованием вакуумной системы	18
Протокол: Выделение и очистка геномной ДНК из образцов крови с использованием центрифуги	22
Контроль качества	25
Ограничения	25
Заявленные характеристики	25
Дальнейшее использование	26
Символы	31
Источники	33
Контактная информация	33
Информация для заказа	34

Назначение набора

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit использует технологию мембран на основе диоксида кремния (технология QIAamp) для выделения и очистки геномной ДНК из биологических образцов..

Набор предназначен для использования профессиональными пользователями (врачи, лаборанты, научные сотрудники), которые обучены молекулярно-биологическим методам.

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit предназначен для диагностики *in vitro*.

Пояснения

В QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit используется хорошо отработанная технология, обеспечивающая быстрый и простой способ выделения и очистки геномной ДНК из 200 мкл цельной крови.

Процедуры QIAamp DSP DNA Blood Mini, разработанные для одновременной обработки нескольких образцов крови, выхода очищенной ДНК, готовой к использованию. Процедуры подходят для использования со свежей или замороженной цельной кровью и кровью, обработанной цитратом или ЭДТА.

Простые процедуры отжима и вакуума QIAamp DSP подходят для одновременной обработки нескольких образцов. Некоторые процедуры QIAamp могут быть полностью автоматизированы на QIAcube® для повышения стандартизации и простоты использования.

Предварительное отделение лейкоцитов не требуется. Процедуры не требуют ни экстракции фенолом / хлороформом, ни осаждения спиртом и требуют минимального взаимодействия с пользователем, что позволяет безопасно обрабатывать потенциально инфекционные образцы.

Процедуры предназначены для минимизации перекрестного загрязнения между образцами. Очищенная ДНК готова для использования в ПЦР или других применениях или, альтернативно, может храниться при температуре от –25°C до –15°C для последующего использования.

Процедура

Каждая процедура QIAamp DSP DNA Blood Mini состоит из 4 этапов:

- Лизис клеток крови
- Связывание геномной ДНК в клеточном лизате с мембраной спиновой колонки QIAamp Mini
- Промывка мембраны
- Элюирование геномной ДНК с мембраны

В этом руководстве содержатся протоколы для 2 альтернативных процедур QIAamp DSP DNA Blood Mini: центрифугирование, для которого требуется центрифуга, и процедуры вакуума, для которой требуются центрифуга и вакуумная система.

Лизис клеток крови

Образцы лизируют в денатурирующих условиях при повышенных температурах. Лизис проводят в присутствии протеазы QIAGEN (QP) и буфера для лизиса (AL).

Связывание геномной ДНК с мембраной спиновой колонки QIAamp Mini

Для оптимизации связывания геномной ДНК с мембраной спиновой колонки QIAamp Mini сначала в лизаты добавляют этанол. Каждый лизат затем наносится на спин-колонку QIAamp Mini, и геномная ДНК адсорбируется на силикагелевой мембране, когда лизат протягивается вакуумным давлением или центробежной силой.

Автоматизация выделения

Очистка ДНК с использованием QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit может быть полностью автоматизирована на QIAcube. Инновационный QIAcube использует передовые технологии для обработки спиновых колонок QIAGEN, обеспечивая бесшовную интеграцию автоматизированной подготовки проб с низкой производительностью в рабочий процесс вашей лаборатории. Приготовление образца с использованием QIAcube выполняется так же, как и ручная процедура (то есть лизирование, связывание, промывание и элюирование), что позволяет вам продолжать использовать QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit для очистки высококачественной ДНК.

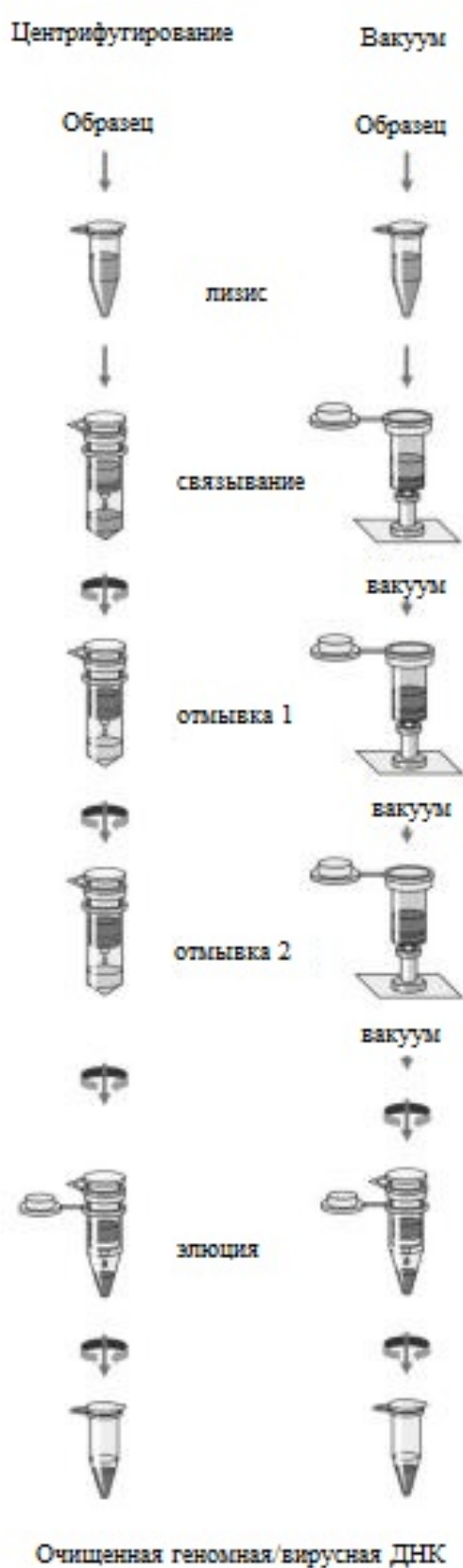
Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре см. Соответствующий лист протокола, доступный по адресу www.qiagen.com/MyQIAcube. Актуальные листы протоколов можно скачать бесплатно или получить, связавшись с отделом технического обслуживания QIAGEN.

При автоматизации набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit на приборе QIAcube прибор может обработать менее 50 образцов из-за мертвых объемов, испарения и дополнительного расхода реагента с помощью автоматического пипетирования. QIAGEN гарантирует только 50 образцов образцов с ручным использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.



Рисунок 1 QIAcube

Процедуры очистки QIAamp DSP DNA Blood Mini



Предоставляемые материалы

Состав набора

Набор реагентов Qiaamp DNA Mini		(50)
Каталожный номер		61104
Количество образцов		50*
	Состав	Количество
Qiaamp Mini Spin	Спин-колонки, каждая в пробирке для сбора образца	50
VC	Вак-коннекторы	50
ET	Элюирующие пробирки 1,5 мл	50
LT	Лизисные пробирки 1,5 мл	50
WT	Отмывочные пробирки 2мл	3x50
AL	Лизисный буфер†	12 мл
AW1	Концентрат отмывочного буфера 1†	19 мл
AW2	Концентрат отмывочного буфера 2†	13 мл
AE	Буфер для элюции†	25 мл
PS	Растворитель протеазы‡	2 мл
QP	Протеаза	1 пробирка

*При автоматизации набора QIAamp DSP DNA Blood Mini на приборе QIAcube прибор может обработать менее 50 образцов из-за мертвых объемов, испарения и дополнительного расхода реагента с помощью автоматического пипетирования. QIAGEN гарантирует только 50 образцов образцов с ручным использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini.

†Содержит гидрохлорид гуанидина. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель.

‡ Содержит азид натрия в качестве консерванта.

§ Объем ресуспендирования 1,2 мл. См. «Подготовка протеазы QIAGEN» на странице 14.

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

Для центрифугирования и вакуума:

- Этанол (96–100%)
- Дозаторы и наконечники пипеток (настоятельно рекомендуем использовать наконечники с аэрозольными барьерами)
- Одноразовые перчатки
- Нагревательный блок для лизиса образцов при 56°C (мы рекомендуем Eppendorf® Thermomixer comfort с термоблоком для 1,5 мл микропробирок †)
- Микроцентрифуга*
- Мерный цилиндр (50 мл)
- Вортекс

Только для вакуума:

- Вакуумная система QIAvac 24 Plus (QIAvac 24 Plus, кат.№ 19413, Соединительная система QIAvac, Кат.№ 19419 и вакуумный насос, Кат.№ 84020) или эквивалентная общая лабораторная вакуумная система

Меры предосторожности

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety , где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буфер для лизиса (AL) и промывочный буфер 1 (AW1) содержат гидрохлорид гуанидина, который может образовывать высокореактивные соединения в сочетании с отбеливателем. Если жидкость, содержащая эти буферы, пролилась, очистите ее подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия. Если буферные бутылки повреждены или протекают, при выбрасывании бутылок надевайте перчатки и защитные очки, чтобы избежать травм.

QIAGEN не проверял жидкие отходы, генерируемые процедурами QIAamp DSP DNA Blood Mini для остаточных инфекционных материалов. Загрязнение жидких отходов остаточными инфекционными материалами маловероятно, но не может быть полностью исключено. Таким образом, жидкие отходы должны считаться инфекционными и должны обрабатываться и выбрасываться в соответствии с местными правилами техники безопасности.

Следующие предупреждения относятся к компонентам QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

Буфер для лизиса (AL) и промывочный буфер 1 (AW1)

Содержат гуанидин гидрохлорид: вредный, раздражающий.

R22-36 / 38, S13-26-36-46.

QIAGEN Протеаза (QP)

Содержит субтилизин: сенсibilизатор, раздражитель.

R37 / 38-41-42, S22-24-26-36 / 37 / 39-46.

*R22: вреден при проглатывании; R36 / 38: раздражает глаза и кожу; 37/38 Раздражает дыхательную систему и кожу; R41: риск серьезного повреждения глаз; R42: Может вызвать сенсibilизацию при вдыхании; S13: Хранить вдали от продуктов питания, напитков и кормов для животных; S22: не вдыхать пыль; S24: избегать контакта с кожей; S26: при попадании в глаза немедленно промыть большим количеством воды и обратиться к врачу; S36: носить подходящую защитную одежду; S36 / 37/39: носить подходящую защитную одежду; S46: При проглатывании немедленно обратитесь к врачу и покажите этот контейнер или этикетку.

Условия транспортировки и хранения реагентов

Колонки QIAamp Mini должны храниться при температуре 2–8°C по прибытии и могут использоваться до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Все буферы могут храниться при комнатной температуре (15–25°C) до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Леофилизированную протеазу QIAGEN (QP) можно хранить при комнатной температуре (15–25°C) до истечения срока годности набора, не влияя на производительность. Восстановленная протеаза QIAGEN стабильна до 1 года при хранении при 2–8°C, но только до истечения срока годности набора.

Восстановленный промывочный буфер 1 (AW1) и восстановленный промывочный буфер 2 (AW2) стабильны до 1 года при хранении при комнатной температуре (15–25°C), но только до истечения срока годности набора.

Условия транспортировки и хранения образцов

Криопреципитаты, образующиеся во время оттаивания замороженных образцов, закупоривают мембрану спиновой колонки QIAamp Mini. Если криопреципитаты видны, избегайте аспирации их во время аспирации образца. Определено влияние замораживания и оттаивания образцов крови на очистку ДНК с использованием мини-набора QIAamp DSP DNA Blood (см. Рисунок 2).

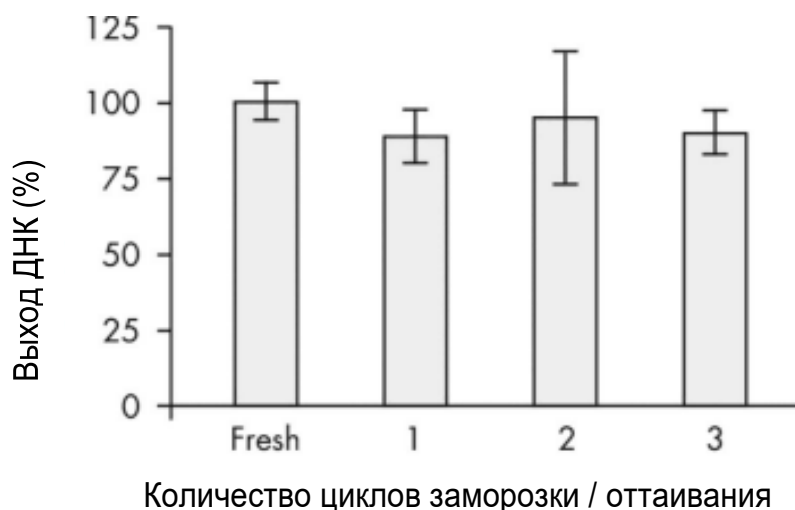


Рисунок 2. Эффекты замораживания и оттаивания образцов крови. Обработанную ЭДТА кровь замораживали и оттаивали до 3 раз, а затем подвергали очистке ДНК с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini. Рассчитанные выходы ДНК нормированы на выход из свежего образца (100%). Каждый столбец на графике представляет результаты 32 повторов (среднее значение ± стандартное отклонение).

Количество ДНК, очищенной в процедурах QIAamp DSP DNA Blood Mini, зависит от содержания лейкоцитов в каждом образце крови. Используя процедуру центрифугирования или вакуума, геномную ДНК очищают из 200 мкл образцов крови от здоровых доноров. Для сбора образцов крови для процедур QIAamp DSP DNA Blood Mini можно использовать различные пробирки и антикоагулянты (таблица 1).

Таблица 1. Средние относительные выходы ДНК из образцов крови, собранных с использованием различных первичных пробирок и антикоагулянтов

Первичная пробирка	Производитель	Кат.№	Объем	Выход
BD™ Vacutainer® 9NC	BD	366007	9 ml	6.4 µg
BD Vacutainer K3E	BD	36847	10 ml	6.6 µg
BD Vacutainer K2E	BD	367864	6 ml	6.4 µg
S-Monovette® EDTA	Sarstedt®	02.1066.001	9 ml	6.5 µg
S-Monovette CPDA1	Sarstedt	01.1610.001	8.5 ml	6.3 µg
Vacurette® K3E	Greiner Bio-One®	455036	9 ml	6.5 µg
Vacurette 9NC	Greiner Bio-One	454382	2 ml	6.3 µg

Геномную ДНК очищали из 200 мкл образцов крови от здоровых доноров (от $4,0 \times 10^6$ клеток на мл до $9,0 \times 10^6$ клеток на мл).

*Для каждой первичной пробирки средний выход определяется по 11 пробам в трех экземплярах.

Удаление контаминантов

Хотя геномная ДНК остается связанной с мембраной мини-спиновой колонки QIAamp, загрязняющие вещества эффективно вымываются с использованием сначала промывочного буфера 1 (AW1), а затем промывочного буфера 2 (AW2).

Элюция ДНК

Геномную ДНК элюируют с мембраны QIAamp Mini Spin Column с использованием 50–200 мкл буфера для элюции (AE). Элюированная ДНК готова для использования, включая различные диагностические анализы *in vitro*.

Важно

Важные моменты перед началом работы

- После получения набора проверьте компоненты на наличие повреждений. Не используйте поврежденные компоненты набора, так как это может привести к снижению производительности набора.
- Всегда меняйте наконечники. Чтобы свести к минимуму перекрестное загрязнение, мы рекомендуем использовать наконечники с фильтрами.
- Все этапы центрифугирования проводятся при комнатной температуре (15–25°C).
- Всегда используйте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте, чтобы они не были загрязнены материалом образца.
- Чтобы минимизировать перекрестное загрязнение, открывайте только одну пробирку за раз.
- Не используйте компоненты набора из других наборов с набором, который вы используете в настоящее время, если номера партий не совпадают.
- Избегайте микробного загрязнения реагентов набора.
- Чтобы свести к минимуму риск заражения потенциально инфекционными материалами, мы рекомендуем работать в условиях ламинарного воздушного потока до этапа лизиса образца.
- Этот набор предназначен для персонала, обученного лабораторной практике диагностики *in vitro*.

Подготовка реагентов и буферов

■ Приготовление протеазы QIAGEN

Добавить 1,2 мл протеазного растворителя (PS) во флакон с лиофилизированной протеазой QIAGEN (QP) и тщательно перемешать. Чтобы избежать пенообразования, смешайте, перевернув флакон несколько раз. Убедитесь, что протеаза QIAGEN (QP) полностью растворена.

Не добавляйте протеазу QIAGEN (QP) непосредственно в буфер лизиса (AL).

■ Подготовка промывочного буфера 1

Используя мерный цилиндр, добавьте 25 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 19 мл концентрата промывочного буфера 1 (AW1). Храните восстановленный промывочный буфер 1 (AW1) при комнатной температуре (15–25°C). Всегда смешивайте восстановленный промывочный буфер 1 (AW1), перевернув бутылочку несколько раз, прежде чем начинать процедуру.

■ Подготовка промывочного буфера 2

Используя мерный цилиндр, добавьте 30 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 13 мл концентрата промывочного буфера 2 (AW2). Храните восстановленный промывочный буфер 2 (AW2) при комнатной температуре (15–25°C). Всегда смешивайте восстановленный промывочный буфер 2 (AW2), перевернув бутылочку несколько раз, прежде чем начинать процедуру.

■ Подготовка буфера для элюции

Одна бутылка с буфером для элюции (AE) предоставляется вместе с набором. Для предотвращения контаминации буфера для элюции (AE) мы настоятельно рекомендуем использовать наконечники с фильтром.

Элюирующий буфер (AE) содержит консервант азида натрия, который демонстрирует поглощение при 260 нм. Следовательно, при количественном определении ДНК в элюате путем измерения оптической плотности при 260 нм, при определении чистоты ДНК в элюате путем измерения оптической плотности при 260 и 280 нм или при сканировании оптической плотности в диапазоне между 220 и 350 нм, убедитесь, что контроль содержит ту же концентрацию азида натрия, что и элюат.

Обращение с колонками QIAamp Mini

Из-за чувствительности технологий амплификации нуклеиновых кислот при обращении со спин-колонками QIAamp Mini необходимо соблюдать следующие меры предосторожности, чтобы избежать перекрестного загрязнения:

- Осторожно нанесите образец или раствор на спин-колонку QIAamp Mini. Вносите образец без смачивания обода колонки.
- Всегда меняйте наконечники. Используйте наконечники с фильтрами.
- Не касайтесь мембраны спиновой колонки QIAamp Mini наконечником.

- После смешивания осадите капли центрифугированием.
- Открывайте только одну пробирку QIAamp Mini за раз.
- Надевайте перчатки на протяжении всей процедуры. В случае контакта перчаток с образцом, немедленно замените перчатки

Элюирование геномной ДНК

Объем ДНК, элюируемой из спиновой колонки QIAamp Mini, может быть на 20 мкл меньше объема буфера для элюции (АЕ), нанесенного на колонку. Объем извлеченного элюата зависит от природы образца. Элюирующий буфер (АЕ) должен быть доведен до комнатной температуры (15–25°C) перед его нанесением на колонку. Элюированная ДНК собирается в элюирующих пробирках (ЕТ). При хранении ДНК до 4 недель мы рекомендуем хранить при 2–8°C. Для длительного хранения рекомендуем хранить при –20°C.

Выход и качество геномной ДНК

Выход и качество выделенной геномной ДНК подходят для многих типов последующих процедур в молекулярной диагностике.

Настройка вакуумной системы QIAvac 24 Plus

Убедитесь, что вы правильно настроили вращающуюся колонку QIAamp Mini, VacConnector (VC) и VacValve (см. Рисунок 3).



Рисунок 3. Сборка компонентов QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit для вакуумной обработки образцов.

1. VacValve (поставляется с вакуумной системой)
2. VacConnector (VC)
3. QIAamp Mini спин колонка

При использовании вакуумной процедуры с вакуумной системой QIAvac 24 Plus мы рекомендуем маркировать лизисные пробирки (LT), элюирующие пробирки (ET) и спиновые колонки QIAamp Mini согласно схеме на рис. 4.

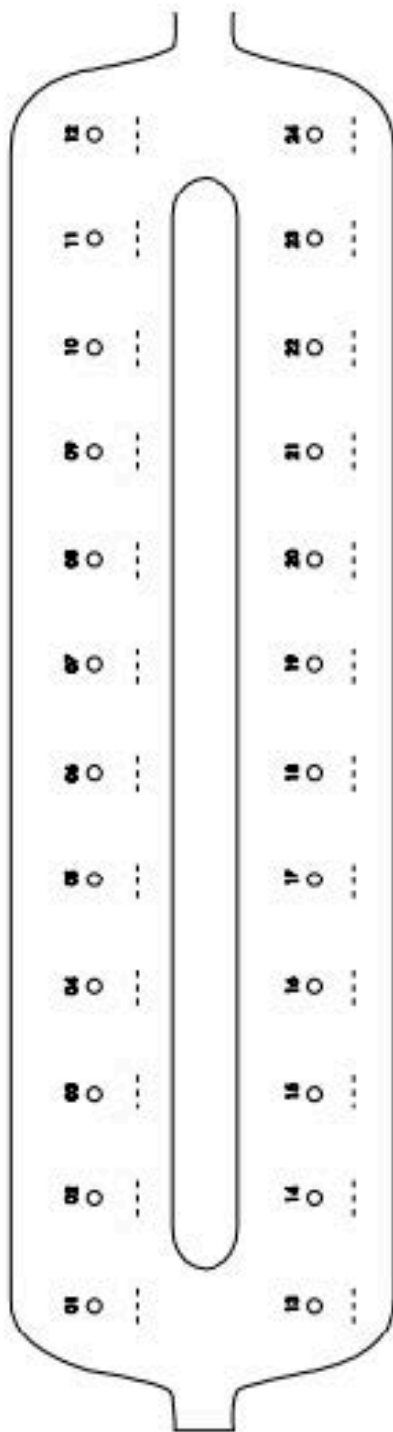


Рисунок 4. Схема маркировки для лизисных пробирок (LT), элюирующих пробирок (ET) и спиновых колонок QIAamp Mini для использования на QIAvac 24 Plus.

Протокол: Выделение и очистка геномной ДНК из образцов крови с использованием вакуумной системы.

Для выделения и очистки геномной ДНК из 200 мкл образцов цельной крови, обработанных ЭДТА или цитратом, используют вакуумную систему QIAvac 24 Plus.

Важные моменты перед началом

- Приведенная ниже процедура содержит инструкции по обработке одного образца крови. Однако в вакуумной системе QIAvac 24 Plus можно обрабатывать до 24 образцов одновременно.

Перед началом работы:

- Доведите образцы крови до комнатной температуры (15–25°C) и перемешайте.
- Если в буфере для лизиса (AL) образовался осадок, растворите его инкубацией при 56°C.
- Убедитесь, что промывочные буферы AW1 и AW2, протеаза QIAGEN (QP) были подготовлены в соответствии с инструкциями в разделе «Подготовка реагентов и буферов».
- Доведите буфера для элюции (AE) до комнатной температуры (15–25°C) для использования на этапе 14.
- Установите нагревательный блок на 56°C для использования в шаге 4.
- Чтобы свести к минимуму перекрестное загрязнение, вставьте VacConnector (VC) в каждый адаптер Luer вакуумной системы.
- Процедуры контроля качества в QIAGEN включают функциональное тестирование выпуска набора для каждой отдельной партии. Поэтому не смешивайте реагенты из разных партий и не комбинируйте отдельные реагенты из разных партий.
- Убедитесь, что емкость для отходов вакуумной системы пуста и все муфты подключены правильно.
- Подробную информацию о работе вакуумной системы, особенно о техническом обслуживании, см. В прилагаемом руководстве.

Процедура

1. Внесите 20 мкл протеазы QIAGEN (QP) в лизисную пробирку (LT).
Проверьте срок годности восстановленной протеазы перед использованием.

2. Добавьте 200 мкл образца крови в лизисную пробирку (LT).

3. Добавьте 200 мкл лизирующего буфера (AL) в лизисную пробирку (LT), закройте крышку и перемешайте на вортексе в течение 15 секунд.

Для обеспечения эффективного лизиса необходимо тщательно перемешать образец и буфер для лизиса, чтобы получить гомогенный раствор. Поскольку буфер для лизиса (AL) имеет высокую вязкость, обязательно добавляйте правильный объем буфера для лизиса (AL), аккуратно пипетируя или используя подходящую пипетку.

Не добавляйте протеазу QIAGEN (QP) непосредственно в буфер лизиса (AL).

4. Инкубировать при 56°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) в течение 10 минут (± 1 минута).

5. Центрифугируйте лизисную пробирку (LT) в течение ≥ 5 секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

6. Добавьте 200 мкл этанола (96–100%) в лизисную пробирку (LT), закройте крышку, и тщательно перемешайте на вортексе в течение ≥ 15 секунд.

7. Центрифугируйте лизисную пробирку (LT) в течение ≥ 5 секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

8. Вставьте спин-колонку QIAamp Mini в VacConnector (VC) в вакуумной системе. Убедитесь, что главный вакуумный клапан (между вакуумной системой и вакуумным коллектором) и клапан с завинчивающейся крышкой (на вакуумном коллекторе) закрыты. Включите вакуумный насос. Удалите промывочные пробирки (WT) (2 мл). Вакуум применяется только к соединительной системе (если используется), а не к вакуумному коллектору.

9. Осторожно нанесите весь лизат (шаг 7), на спин-колонку QIAamp Mini, не смачивая обод. Не прикасайтесь к мембране спиновой колонки QIAamp Mini кончиком пипетки. При обработке нескольких образцов открывайте только одну лизисную пробирку (LT) за раз.

10. Откройте главный вакуумный клапан. После прохождения лизата через спин-колонку QIAamp Mini закройте главный вакуумный клапан и откройте клапан с винтовой крышкой на вакуумном коллекторе, чтобы выпустить воздух из коллектора. Закройте клапан с винтовой крышкой после того, как вакуум будет выпущен из

коллектора. После закрытия основного вакуумного клапана, вакуум применяется только к соединительной системе (если используется), а не к вакуумному коллектору. Используйте клапан с винтовой крышкой вакуумного коллектора для быстрого выпуска вакуума. Если обрабатывается несколько колонок QIAamp Mini одновременно, мы рекомендуем закрыть VacValve каждой колонки после прохождения лизата, чтобы сократить продолжительность этого этапа вакуума. Если лизат не прошел полностью через мембрану через 10 минут, поместите спин-колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT), закройте крышку и центрифугируйте при 6000 мкг (8000 об / мин) в течение 3 минут или пока лизат не прошел полностью. Поместите спин-колонку QIAamp Mini в другую чистую промывочную пробирку (WT) и продолжите с шага 10 протокола. Если лизат все еще не проходит через мембрану во время центрифугирования, выбросьте образец и повторите выделение и очистку с новым образцом материала, начиная с шага 1.

11. Нанесите 750 мкл промывочного буфера 1 (AW1) на спин-колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и откройте главный вакуумный клапан. После прохождения промывочного буфера 1 (AW1) через спин-колонку QIAamp Mini закройте главный вакуумный клапан и откройте клапан с винтовой крышкой, чтобы выпустить воздух из коллектора. Закройте клапан с винтовой крышкой после того, как вакуум будет выпущен из коллектора.

12. Нанесите 750 мкл промывочного буфера 2 (AW2) на спин-колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и откройте главный вакуумный клапан. После прохождения промывочного буфера 2 (AW2) через спин-колонку QIAamp Mini закройте главный вакуумный клапан и откройте клапан с винтовой крышкой, чтобы выпустить воздух из коллектора. Закройте клапан с винтовой крышкой после того, как вакуум будет выпущен из коллектора.

13. Закройте крышку колонки QIAamp Mini, снимите ее с вакуумной системы и выбросьте VacConnector (VC). Поместите колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT) и центрифугируйте на полной скорости (приблизительно 20 000 x g или 14 000 об / мин) в течение 3 минут, чтобы полностью высушить мембрану.

14. Поместите спин-колонку QIAamp Mini в чистую элюирующую пробирку (ET) и выбросьте промывочную пробирку (WT), содержащую фильтрат. Аккуратно

откройте крышку колонки QIAamp Mini и нанесите от 50 до 200 мкл буфера для элюции (AE) в центр мембраны. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре (15–25°C) в течение 1 минуты. Центрифугируйте при 6000 x g (8000 об / мин) в течение 1 минуты, чтобы элюировать ДНК. Следуйте процедуре обслуживания вакуумной системы после выполнения этого протокола (см. Руководство, поставляемое с вакуумной системой, для получения более подробной информации).

Протокол: Выделение и очистка геномной ДНК из образцов крови с использованием центрифуги.

Для выделения и очистки геномной ДНК из 200 мкл образцов цельной крови, обработанных ЭДТА или цитратом, используют центрифугу.

Важные моменты перед началом

- В приведенной ниже процедуре приведены инструкции по обработке одного образца крови. Тем не менее, несколько образцов могут быть обработаны одновременно; количество зависит от емкости используемой микроцентрифуги.

Перед началом работы:

- Доведите образцы крови до комнатной температуры (15–25°C) и перемешайте.
- Если в буфере для лизиса (AL) образовался осадок, растворите его инкубацией при 56°C.
- Убедитесь, что промывочные буферы AW1 и AW2, протеаза QIAGEN (QP) были подготовлены в соответствии с инструкциями в разделе «Подготовка реагентов и буферов».
- Доведите буфера для элюции (AE) до комнатной температуры (15–25°C) для использования на этапе 14.
- Установите нагревательный блок на 56°C для использования в шаге 4.
- Процедуры контроля качества в QIAGEN включают функциональное тестирование выпуска набора для каждой отдельной партии. Поэтому не смешивайте реагенты из разных партий и не комбинируйте отдельные реагенты из разных партий.

Процедура

1. Внесите 20 мкл протеазы QIAGEN (QP) в лизисную пробирку (LT). Проверьте срок годности восстановленной протеазы перед использованием.
2. Добавьте 200 мкл образца крови в лизисную пробирку (LT).
3. Добавьте 200 мкл лизирующего буфера (AL) в лизисную пробирку (LT), закройте крышку и перемешайте на вортексе в течение 15 секунд.

Для обеспечения эффективного лизиса необходимо тщательно перемешать образец и буфер для лизиса, чтобы получить гомогенный раствор. Поскольку буфер для лизиса (AL) имеет высокую вязкость, обязательно добавьте правильный объем буфера для лизиса (AL), аккуратно пипетируя.

Не добавляйте протеазу QIAGEN (QP) непосредственно в буфер лизиса (AL).

4. Инкубируйте при 56°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) в течение 10 минут (± 1 минута).

5. Центрифугируйте лизисную пробирку (LT) в течение ≥ 5 секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

6. Добавьте 200 мкл этанола (96–100%) в лизисную пробирку (LT), закройте крышку, и тщательно перемешайте на вортексе в течение ≥ 15 секунд.

7. Центрифугируйте лизисную пробирку (LT) в течение ≥ 5 секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.

8. Осторожно нанесите весь лизат (шаг 7), на спин-колонку QIAamp Mini. Не прикасайтесь к мембране спиновой колонки QIAamp Mini наконечником. При обработке нескольких образцов открывайте только одну лизисную пробирку (LT) за раз.

9. Закройте колонку QIAamp Mini и центрифугируйте примерно при 6000 x g в течение 1 минуты. Поместите спин-колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT) и выбросьте пробирку, содержащую фильтрат.

Если лизат не прошел полностью через мембрану после центрифугирования при 6000 x g (8000 об / мин), снова центрифугируйте на полной скорости (до 20 800 x g) в течение 1 минуты.

Если лизат все еще не проходит через мембрану во время центрифугирования, выбросьте образец и повторите выделение и очистку с новым материалом образца, начиная с шага 1 на странице 22.

10. Осторожно откройте спин-колонку QIAamp Mini и добавьте 500 мкл промывочного буфера 1 (AW1).

11. Закройте крышку QIAamp Mini и центрифугируйте примерно при 6000 x g в течение 1 минуты. Поместите спин-колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT) и выбросьте пробирку, содержащую фильтрат.

12. Аккуратно откройте колонку QIAamp Mini и добавьте 500 мкл промывочного буфера 2 (AW2).

13. Закройте крышку QIAamp Mini и центрифугируйте на полной скорости (приблизительно 20 000 x g или 14 000 об / мин) в течение 1 минуты. Поместите спин-колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT) и выбросьте пробирку, содержащую фильтрат.

14. Центрифугируйте на полной скорости (примерно 20000 x g, или 14000 об / мин) в течение 3 минут, чтобы полностью высушить мембрану.

15. Поместите спин-колонку QIAamp Mini в чистую элюирующую пробирку (ET) и выбросьте промывочную пробирку (WT), содержащую фильтрат. Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp Mini и нанесите от 50 до 200 мкл буфера для элюции (AE) в центр мембраны. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре (15–25°C) в течение 1 минуты. Центрифугируйте на 6000 x g (8000 об / мин) в течение 1 минуты, чтобы элюировать ДНК.

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия наборов QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit проверяется на соответствие заранее установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

Производительность системы была установлена с использованием цельной крови для выделения геномной ДНК.

Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности системы для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями по оценке эффективности QIAGEN.

Чтобы свести к минимуму риск негативного влияния на результаты диагностики, следует использовать соответствующие средства контроля при последующих применениях.

Любые результаты диагностики должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими или лабораторными данными.

Заявленные характеристики

Выход очищенной ДНК

Линейный диапазон выхода ДНК с использованием вакуумной процедуры QIAamp DSP DNA Blood Mini был определен для крови здоровых доноров с количеством лейкоцитов $3,8 \times 10^6$ - $1,34 \times 10^7$ клеток / мл (см. Рисунок 5).

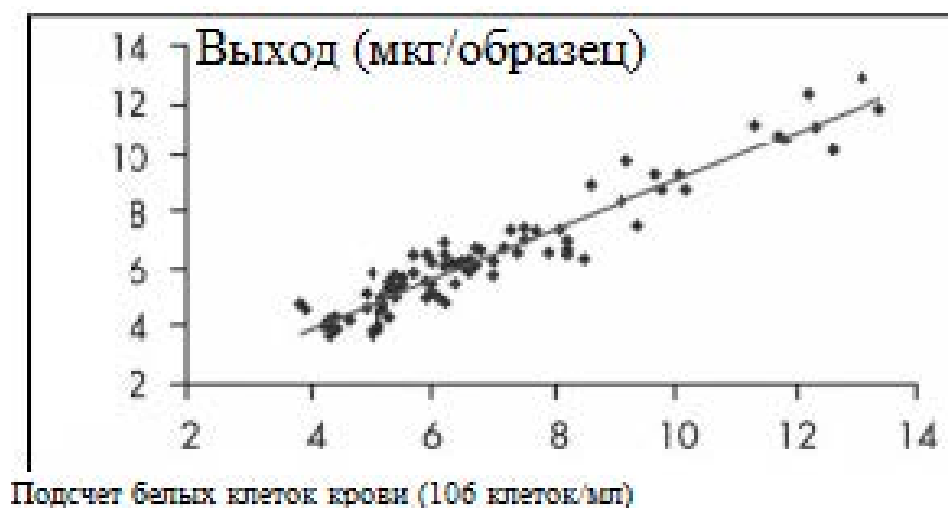


Рисунок 5. Линейный диапазон выхода ДНК с использованием вакуумной процедуры QIAamp DSP DNA Blood Mini с объемом элюции 200 мкл. Количество лейкоцитов у здоровых доноров было определено и находилось в диапазоне $3,8 \times 10^6$ - $1,34 \times 10^7$ клеток / мл. ДНК очищали от образцов крови с использованием вакуумной процедуры QIAamp DSP DNA Blood Mini с объемом элюции 200 мкл. Восемьдесят семь пробных образцов были обработаны.

Дальнейшее использование

Элюированная геномная ДНК готова для использования в различных последующих анализах, включая различные диагностические анализы *in vitro* (таблицы 2–6). Влияние объема элюирования и объема элюата, использованного в ПЦР, на эффективность ПЦР было определено (см. Таблицу 7).

Таблица 2. HLA-типирование с использованием SSP Dynal® AllSet +™ HLA-A «Низкое разрешение», HLA-B «Низкое разрешение», DR «Низкое разрешение» и DQ «Низкое разрешение»

HLA локус A		HLA локус B		HLA локус DR		HLA локус DQ	
Генотип	№	Генотип	№	Генотип	№	Генотип	№
A2/A3	2	B51, B51/ B13, B51/B27	1	DR1/DR3	1	DQ2	1
A3/A1	1	B13/B35	1	DR3 DR3/DR13	1	DQ2/DQ3	2
A3/A25	1	B8/B27	1	DR3/DR7	1	DQ6	1
A2/A24	2	B7/B13 B7/B15	1	DR7/DR15	2	DQ2/DQ5	1
A1/A2	2	B7/B18	1	DR4/DR15	1	DQ2/DQ5	2
A30/A68	1	B7/B44	1	DR4/DR7	1	DQ3	1
A2/A32	1		0	DR4	1	DQ3/DQ6	2
	0			DR15	1		0
				DR1/DR7	1		
				Other	0		

Цельную кровь собирали у отдельных доноров, а геномную ДНК очищали из 200 мкл цельной крови с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. С использованием анализов Dynal AllSet + SSP (Dynal Biotech) аллели были идентифицированы в указанных локусах у данного числа особей.

Таблица 3. Генотипирование фактора V Лейдена (FV) с использованием набора для выявления лейденской мутации LightCycler® Factor V

Генотип	Номер
Диккий тип	17
FV G16191 A гетерозигота	13
FV G16191 A гомозигота	0

Цельную кровь собирали у 30 отдельных доноров, а геномную ДНК очищали из 200 мкл цельной крови с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Аллельный статус в FV G1691 A локус определяли с использованием набора для выявления лейденской мутации LightCycler Factor V (Roche Group).

Таблица 4. Генотипирование фактора V Лейдена (FV) по конечной точке и методом пиросеквенирования

Генотип	Номер
Диккий тип	17
FV G16191 A гетерозигота	13
FV G16191 A гомозигота	0

Цельную кровь собирали у 30 отдельных доноров, а геномную ДНК очищали из 200 мкл цельной крови с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Аллельный статус в FV G1691 A локус определяли с использованием ПЦР конечной точки и анализа пиросеквенирования с набором реагентов PSP-96 для пиросеквенирования PSQ 96MA (Biotage).

Таблица 5. Генотипирование протромбина (PT) по конечной точке и методом пиросеквенирования

Генотип	Номер
Дикий тип	30
PT G20210A гетерозигота	0
PT G20210A гетерозигота	0

Цельную кровь собирали у 30 отдельных доноров, а геномную ДНК очищали из 200 мкл цельной крови с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Аллельный статус в локусе PT G20210A определяли с использованием ПЦР в конечной точке и анализа пиросеквенирования с набором реагентов PSP-96 SNP для пиросеквенирования PSQ 96MA (Biotage).

Таблица 6. Анализ полиморфизмов ApoE T112C и C158T по конечной точке и секвенированием

Генотип	Номер
ApoE*3/*3	5
ApoE*3/*4	5
Другие	0

Цельную кровь собирали у 10 отдельных доноров, а геномную ДНК очищали из 200 мкл цельной крови, используя наборы QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Анализ полиморфизмов ApoE T112C и C158T проводили методом ПЦР с последующим секвенированием ампликона с использованием набора для определения последовательности BigDye v1.1 Ready и разделения на генетическом анализаторе ABI PRISM 3100 (Life Technologies Corporation).

Таблица 7. Влияние объема элюирования и объема элюата, используемого в ПЦР, на эффективность ПЦР

Объем элюции	Объем элюата 50 µl PCR*		
	2 µl	5 µl	10 µl
50 µl	100%	100%	100%
100 µl	100%	100%	97%
200 µl	100%	100%	100%

*Значения показывают частоту попаданий ПЦР и представляют собой среднее из 48 образцов.

Стабильность элюата

В тестах на хранение с элюатами, полученными с использованием набора QIAamp DNA Blood Mini, набора для общего лабораторного использования с использованием идентичной технологии, было показано, что ДНК, элюируемая из спин-колонок QIAamp Mini в буфере AE, была стабильной в течение 8 лет при хранении при 5°C или –20°C (рис. 6). Тем не менее, продолжаются долгосрочные исследования стабильности элюатов, полученных с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

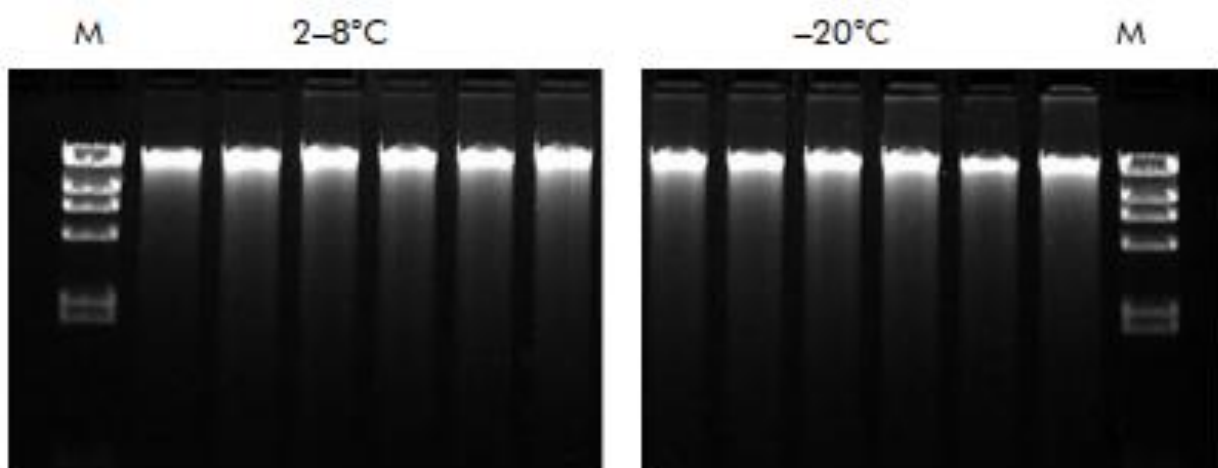
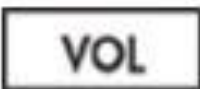


Рисунок 6. Долгосрочная стабильность ДНК, выделенной и очищенной с использованием спиновых колонок QIAamp Mini. ДНК очищали с использованием мини-набора QIAamp DNA Blood, элюировали в 200 мкл буфера AE и хранили при температуре 2–8°C или –20°C в течение 8 лет. Образцы ДНК анализировали на окрашенном этидием бромидом агарозном геле. М: маркер.

Символы

Символы в следующей таблице включают символы, используемые в этих инструкциях по применению.

	Содержит количество реагентов для N тестов
	Использовать до
	Для диагностики <i>in vitro</i>
	Каталожный номер
	Номер лота
	Номер материала
	Компоненты
	Количество
	Версия и номер инструкции
	Объем
	Температурные ограничения
	Производитель
	Только для использования с

EC	REP	Авторизованный представитель в Европе
		См. инструкцию пользователя
CONT		Содержит
WELL		Номер ячейки
REAG	CART	Картридж с реагентами
ELU	BUF	Буфер элюции
IPA		Изопропанол
PROTK		Протеиназа К
GTC		Гуанидин тиоционат
GuHCL		Гуанидин гидрохлорид
EtOH		Этанол
MALEIC ACID		Малеиновая кислота
BRU 58		BRU 58
LiCl		Хлорид лития
GTIN		Global Trade Item Number
		Внимание
		Острый

Источники

QIAGEN поддерживает обширную, актуальную онлайн-базу научных публикаций, использующих продукты QIAGEN. Широкие возможности поиска позволяют вам найти нужные статьи, либо с помощью простого поиска по ключевым словам, либо указав приложение, область исследования, название и т. д.

Для получения полного списка ссылок посетите справочную базу данных QIAGEN в Интернете по адресу www.qiagen.com/RefDB/search.asp или обратитесь в службу технической поддержки QIAGEN или к местному дистрибьютору.

Контактная информация

В QIAGEN мы гордимся качеством и доступностью нашей технической поддержки. Наши отделы технического обслуживания укомплектованы опытными учеными, обладающими обширными практическими и теоретическими знаниями в области технологий отбора проб и анализа и использования продуктов QIAGEN. Если у вас есть какие-либо вопросы или какие-либо трудности в отношении QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit или продуктов QIAGEN в целом, пожалуйста, не стесняйтесь обращаться к нам.

Клиенты QIAGEN являются основным источником информации о продвинутом или специализированном использовании наших продуктов. Эта информация полезна для других ученых, а также для исследователей QIAGEN. Поэтому мы рекомендуем вам связаться с нами, если у вас есть какие-либо предложения по поводу производительности продукта или новых приложений и методов.

Для получения технической поддержки и получения дополнительной информации посетите наш Центр технической поддержки по адресу www.qiagen.com/Support или позвоните в один из отделов технического обслуживания QIAGEN или к местным дистрибьюторам.

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724, Хильден, Германия

Информация для заказа

Продукт	Описание	Cat.no
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Для 50 выделений ДНК: колонки QIAamp Mini, VacConnectors, протеазы QIAGEN, реагенты, буферы и пробирки для сбора	61104
Связанные продукты		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Вакуумный коллектор для обработки 1–24 спиновых колонок: QIAvac 24 Plus Вакуумный коллектор, Люэр, Быстроразъемные соединения	19413
Vacuum Pump*	Универсальный вакуумный насос	84020

Справочники и руководства пользователя по наборам QIAGEN доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены у технической службы QIAGEN или у местного дистрибьютора.

Заказ www.qiagen.com/shop

Техническая поддержка support.qiagen.com

Веб-сайт www.qiagen.com

Сентябрь 2019

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit Руководство пользователя

Версия 1



50



61504

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

1118364

Sample to Insight



Содержание

Расширенное использование	4
Резюме	4
Принципы процедуры.....	5
Предоставляемые материалы	10
Необходимые, но не предоставленные материалы	11
Предупреждения и меры предосторожности.....	12
Хранение реагентов и обращение с ними	15
Хранение и обращение с образцами	16
Процедура	17
Приготовление буферов и реагентов	24
Протокол Бриза: очистка циркулирующих НК из 1–5 мл плазмы крови человека	27
Классический протокол: очистка циркулирующих НК из 1–5 мл плазмы крови человека	32
Контроль качества	37
Ограничения	37
Символы	38
Ссылки	40
Контактная информация.....	40
Руководство по устранению неполадок.....	41
Приложение А: Рекомендации по разделению и хранению плазмы крови	43
Приложение В: Общие замечания по обращению с РНК	45
Информация для заказа	46
История редакций руководства	47

Расширенное использование

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit - это система, в которой используется технология кремниевых мембран (технология QIAamp) для выделения и очистки циркулирующих бесклеточных ДНК и РНК из образцов плазмы крови человека.

Продукт предназначен для использования профессиональными пользователями, такими как техники и врачи, прошедшие обучение молекулярно-биологическим методам.

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit предназначен для диагностики in vitro.

Резюме

Свободно циркулирующие нуклеиновые кислоты обычно присутствуют в плазме человека в виде коротких фрагментов <1000 п.н. (ДНК), <1000 н. (РНК) или всего 20 н. (МиРНК). Концентрация свободно циркулирующих нуклеиновых кислот в плазме крови человека обычно невысока и значительно варьирует у разных людей в пределах 1–100 нг / мл в образцах крови человека (1–5).

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit обеспечивает эффективную очистку циркулирующих нуклеиновых кислот из плазмы крови человека. Образцы могут быть свежими или замороженными. Пробирки и вакуумная обработка на QIAvac 24 Plus позволяют использовать исходные объемы образцов до 5 мл, а гибкие объемы элюирования от 20 до 150 мкл позволяют концентрировать те виды нуклеиновых кислот, которые присутствуют в низких концентрациях.

Элюированная свободно циркулирующая геномная ДНК или РНК готова к использованию в последующих приложениях или пригодна для хранения. Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit обеспечивает эффективное удаление белков, нуклеаз и других примесей.

Принципы процедуры

Процедура QIAamp DSP Circulating NA включает 4 этапа (лизирование, связывание, промывка и элюирование) и выполняется с использованием колонок QIAamp Mini в системе QIAvac. Надежная процедура помогает свести к минимуму перекрестное загрязнение между образцами и повышает безопасность пользователя при работе с потенциально инфекционными образцами.

Простая процедура подходит для одновременной обработки до 24 образцов менее чем за 2 часа.

Объемы образцов

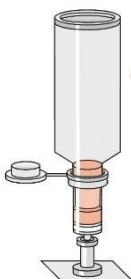
Колонки QIAamp Mini связывают фрагментированные нуклеиновые кислоты длиной от 20 нуклеотидов, но выход зависит от объема образца и концентрации циркулирующих нуклеиновых кислот в образце (обычно 1–100 нг / мл в плазме). Процедура QIAamp DSP Circulating NA оптимизирована для образцов объемом до 5 мл.

Протокол

Образец



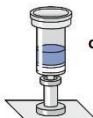
ЛИЗИС



СВЯЗЫВАНИЕ



ВАКУУМ



ОТМЫВКА



ВАКУУМ



ЭЛЮЦИЯ



ОЧИЩЕННЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

Рисунок 1. Обзор процедуры набора QIAamp DSP Circulating NA Kit

Лизирование образцов

Свободно циркулирующие нуклеиновые кислоты в биологических жидкостях обычно связаны с белками или заключены в пузырьки, что требует эффективного этапа лизиса для высвобождения нуклеиновых кислот для селективного связывания с колонкой QIAamp Mini. Следовательно, образцы лизируются в сильно денатурирующих условиях при повышенных температурах в присутствии протеиназы К и буфера ACL, что обеспечивает инактивацию ДНКаз и РНКаз и высвобождение нуклеиновых кислот из связанных белков, липидов и везикул.

Адсорбция на мембране колонки QIAamp Mini

Чтобы обеспечить оптимальное связывание циркулирующих нуклеиновых кислот с мембраной, условия связывания регулируют путем добавления буфера ACB к лизату. Затем лизаты переносят на колонку QIAamp Mini, и циркулирующие нуклеиновые кислоты адсорбируются из большого объема на кремнеземную мембрану, когда лизат протягивается под давлением вакуума. Условия соли и pH гарантируют, что большинство белков и других загрязняющих веществ, которые могут ингибировать ПЦР и другие последующие ферментативные реакции, не удерживаются на мембране колонки QIAamp Mini.

Для протокола требуются вакуумный коллектор (например, QIAvac 24 Plus с системой подключения QIAvac) и вакуумный насос, способный создавать вакуум ~ 800–900 мбар (например, вакуумный насос QIAGEN®). Следует использовать регулятор вакуума (часть соединительной системы QIAvac) для легкого контроля давления вакуума и удобного сброса вакуума.

Удаление остаточных загрязнений

Нуклеиновые кислоты остаются связанными с мембраной, а загрязнения эффективно смываются за 3 этапа промывки.

Элюирование чистых нуклеиновых кислот

Элюирование выполняется буфером AVE. В одну стадию циркулирующие нуклеиновые кислоты высокой чистоты элюируются в буфере AVE, уравновешенном до комнатной температуры. Может применяться гибкий объем элюирования от 50 до 150 мкл. Если требуются более высокие концентрации нуклеиновой кислоты, объем элюирования можно уменьшить до 20 мкл. Объемы элюирования менее 50 мкл приводят к более низкому концентрированным элюатам нуклеиновых кислот, но могут приводить к более низкому общему выходу.

Извлеченный объем элюата может быть на 5 мкл меньше объема элюирующего буфера, нанесенного на колонку.

Выход и размер нуклеиновых кислот

Выходы свободно циркулирующих нуклеиновых кислот, выделенных из биологических образцов, обычно ниже 1 мкг, и поэтому их трудно определить с помощью спектрофотометра. Абсолютный выход циркулирующей ДНК и РНК, полученный из образца с использованием набора QIAamp DSP Circulating NA Kit, варьируется между образцами, взятыми у разных людей, а также зависит от других факторов (например, определенных болезненных состояний). Кроме того, РНК-носитель, присутствующая в экстрагированных нуклеиновых кислотах, вероятно, будет доминировать в показаниях УФ-поглощения (см. Стр. 25). Для определения выхода рекомендуются методы количественной амплификации.

Распределение по размеру циркулирующих нуклеиновых кислот, очищенных с использованием набора QIAamp DSP Circulating NA Kit, можно проверить с помощью электрофореза в агарозном геле или гибридизации с зондом, специфичным для probe5, или раствором для микрофлюидного электрофореза (например, Agilent Bioanalyzer).

Описание протоколов

В этом руководстве представлены два разных протокола.

«Протокол Breeze: очистка циркулирующих нуклеиновых кислот из 1–5 мл плазмы крови человека» (стр. 27) предназначен для обработки до 5 мл плазмы с шагом 1 мл и оптимизирован для сокращения времени обработки и обработки.

«Классический протокол: очистка циркулирующих нуклеиновых кислот из 1–5 мл плазмы крови человека» (стр. 32) предназначен для обработки до 5 мл плазмы с шагом 1 мл и представляет собой неизменный протокол QIAamp DSP, циркулирующего в справочнике по набору NA, редакция 3 (R3).

Предоставляемые материалы

Состав набора

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
Каталожный №			61504
Количество образцов			50
QIAamp Mini	Колонки QIAamp Mini с промывочными пробирками (WT) (2 мл)	COL	50
EXT	Расширители колонок (20 мл)	COL EXT	2 x 25
WT	Промывочные тубы (2 мл)	WASH TUBE	50
ET	Пробирки для элюирования (1,5 мл)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC CON	50
ACL*	Буфер для лизиса *		220 мл
ACB*	Связывающий буфер * (концентрат)		300 мл
ACW1*	Промывочный буфер 1 * (концентрат)	LYS BUF	19 мл
ACW2†	Промывочный буфер 2 † (концентрат)	WASH BUF 1 CONC	13 мл
AVE†	Буфер для элюции † (фиолетовые колпачки)	ELU BUF	5 x 2 мл
PROTK	QIAGEN Протеиназа K	PROTK	4 x 7 мл
Carrier	РНК-носитель (красные колпачки)	CAR RNA	310 мкг
	Руководство пользователя	H B	1

* Содержит хаотропную соль. См. Стр. 12 с предупреждениями и мерами предосторожности.

† Содержит азид натрия в качестве консерванта.

Необходимые, но не представленные материалы

При работе с химическими веществами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

Убедитесь, что инструменты были проверены и откалиброваны в соответствии с рекомендациями производителя.

Для всех протоколов

- Пипетки (регулируемые)
- Стерильные наконечники для пипеток (рекомендуется использовать наконечники для пипеток с аэрозольными барьерами для предотвращения перекрестного заражения)
- Водяная баня или нагревательный блок, вмещающий центрифужные пробирки объемом 50 мл при температуре 56 ° C или 60 ° C *
- Нагревательный блок или аналогичный при 56 ° C, вмещающий 2 мл промывные пробирки (только для классического протокола) *
- Микроцентрифуга (с ротором для пробирок 2 мл) *
- Центрифужные пробирки на 50 мл
- Вакуумный коллектор QIAvac 24 Plus (кат. № 19413)
- Система подключения QIAvac (каталожный номер 19419) или аналогичная
- Вакуумный насос (каталожный номер 84010 [США и Канада], 84000 [Япония] или 84020 [остальной мир]) или эквивалентный насос, способный создавать вакуум от –800 до –900 мбар.
- Этанол (96–100%) †
- Изопропанол (100%)
- Колотый лед (только для «Классического протокола: очистка циркулирующих нуклеиновых кислот из 1–5 мл плазмы крови человека»).
- Некоторые образцы могут потребовать разбавления физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS).
- Дополнительно: VacValves (кат. № 19408) Optional: VacValves (cat. no. 19408)

* Убедитесь, что инструменты были проверены и откалиброваны в соответствии с рекомендациями производителя.

† Не используйте денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон.

Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики in vitro

При работе с химическими веществами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS). Они доступны в удобном и компактном формате PDF на сайте www.qiagen.com/safety, где вы можете найти, просмотреть и распечатать паспортов безопасности для каждого комплекта QIAGEN и его компонентов.

WARNING



Риск получения травм

ЗАПРЕЩАЕТСЯ добавлять отбеливатель или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буфер ACL, буфер ACB и буфер ACW1 содержат соли гуанидина, которые могут образовывать высокореактивные соединения в сочетании с отбеливателем.

Если жидкость, содержащая эти буферы, пролита, очистите ее подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если пролитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% (об. / Об.) Гипохлоритом натрия.

Следующие ниже меры предосторожности и опасности относятся к компонентам набора QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Буфер ACB



Содержит: тиоцианат гуанидина. Опасность! Вред при проглатывании. Может нанести вред при контакте с кожей или при вдыхании. Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. При контакте с кислотами выделяется очень токсичный газ. Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица. ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть, и это легко сделать. Продолжайте полоскание. Немедленно обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу / терапевту.

Буфер ACL



Содержит: тиоцианат гуанидина. Опасность! Вред при проглатывании. Может нанести вред при контакте с кожей или при вдыхании. Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. При контакте с кислотами выделяется очень токсичный газ. Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица. ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть глаза водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть, и это легко сделать. Продолжайте полоскание. Немедленно обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу / терапевту.

Буфер ACW1



Содержит: гуанидин гидрохлорид. Предупреждение! Вредно при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица.

Протеиназа К



Содержит: протеиназу К. Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. При вдыхании может вызвать симптомы аллергии, астмы или затруднение дыхания. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / аэрозолей. Пользоваться защитными перчатками / защитной одеждой / средствами защиты глаз / лица. Используйте средства защиты органов дыхания. В случае воздействия или беспокойства: обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу / терапевту. Выведите человека на свежий воздух и обеспечьте ему удобство для дыхания.

Хранение реагентов и обращение с ними

Колонки QIAamp Mini следует хранить в сухом месте при температуре 2–8 ° С. Все буферы следует хранить при комнатной температуре (15–25 ° С). Колонки и буферы QIAamp Mini можно хранить в этих условиях до истечения срока годности, указанного на упаковке набора, без какого-либо снижения производительности.

Лиофилизированную РНК-носитель следует хранить при комнатной температуре (15–25 ° С) до истечения срока годности, указанного на этикетке компонента. РНК-носитель следует растворить в буфере AVE; растворенную РНК-носитель следует немедленно добавить в буфер ACL, как описано на стр. 28 для протокола Breeze и на стр. 33 для классического протокола. Этот раствор должен быть приготовлен свежим и стабилен при 2–8 ° С до 48 часов. Неиспользованные части РНК-носителя, растворенные в буфере AVE, должны быть заморожены в аликвотах при температуре от –30 до –15 ° С.

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit содержит готовый к использованию раствор протеиназы К, растворенный в специально разработанном буфере для хранения. Протеиназа К стабильна до истечения срока годности, указанного на этикетке компонента, при хранении при комнатной температуре (15–25 ° С).

Хранение и обращение с образцами

Хранение и обращение с кровью

Чтобы избежать деградации бесклеточных нуклеиновых кислот и высвобождения клеточных нуклеиновых кислот, мы рекомендуем хранить цельную кровь не более 6 часов при 2–8 °С (например, образцы ЭДТА). При использовании стабилизированных пробирок для забора крови необходимо учитывать условия хранения, указанные производителем. Мы рекомендуем проверять эти условия хранения в сочетании с вашим конкретным последующим применением и целью.

Хранение плазмы и обращение с ней

При использовании ЭДТА в качестве антикоагулянта, особенно для РНК, рекомендуется проводить отделение плазмы и выделение нуклеиновых кислот сразу после сдачи крови. При кратковременном хранении плазму можно хранить до 24 часов при 2–8 °С.

Для более длительного хранения аликвоты плазмы как из стабилизированных, так и из нестабилизированных пробирок для забора крови можно хранить при температуре –20°C (только для ДНК в качестве мишени) или –80°C (ДНК и РНК в качестве мишени) не менее 4 недель.

Хранение элюированных нуклеиновых кислот

Элюированные нуклеиновые кислоты собирают в пробирки для элюирования объемом 1,5 мл (прилагаются). Очищенные циркулирующие нуклеиновые кислоты можно хранить до 24 часов при 2–8 °С. Для периодов хранения более 24 часов рекомендуется хранение при температуре от –30 до –15 °С для ДНК и от –90 до –60 °С для последующих применений РНК.

Процедура

Важные моменты перед началом

QIAvac 24 Plus

QIAvac 24 Plus разработан для быстрой и эффективной вакуумной обработки до 24 спин-колонок QIAGEN параллельно. Образцы и промывочные растворы протягиваются через мембраны колонки с помощью вакуума вместо центрифугирования, что обеспечивает большую скорость и сокращение времени, затрачиваемого на выполнение процедур очистки.

В сочетании с системой подключения QIAvac, QIAvac 24 Plus может использоваться как проточная система. Проточная проба собирается в отдельную емкость для отходов.

Для обслуживания QIAvac 24 Plus см. Инструкции по обращению в Руководстве QIAvac 24 Plus.

Обработка колонок QIAamp Mini на QIAvac 24 Plus

Колонки QIAamp Mini обрабатываются на QIAvac 24 Plus с использованием одноразовых соединителей VacConnectors и многоразовых клапанов VacValves. VacValves (опционально) вставляются непосредственно в люэровские прорези коллектора QIAvac 24 Plus и обеспечивают стабильную скорость потока, облегчая параллельную обработку различных объемов проб. Их следует использовать, если скорости потока пробы значительно различаются, чтобы обеспечить постоянный вакуум. VacConnectors - это одноразовые разъемы, которые устанавливаются между колонками QIAamp Mini и VacValves или между колонками QIAamp Mini и люэровскими слотами QIAvac 24 Plus. Они предотвращают прямой контакт между спин-колонок и VacValve во время очистки, тем самым предотвращая перекрестное загрязнение между образцами. VacConnectors выбрасываются после однократного использования. Из-за используемых больших объемов раствора требуется система подключения QIAvac (или аналогичная установка с емкостями для отходов) (см. Рисунок 2).

Рекомендации по обращению с QIAvac 24 Plus

- Всегда размещайте QIAvac 24 Plus на надежном столе или на рабочем месте. При падении коллектор QIAvac 24 Plus может треснуть.
- Всегда храните QIAvac 24 Plus чистым и сухим. Информацию о процедурах очистки см. В Руководстве по QIAvac 24 Plus.
- Компоненты QIAvac 24 Plus не устойчивы к определенным растворителям (Таблица 1). Если эти растворители пролились на устройство, тщательно промойте его водой.
- Для обеспечения стабильной работы не наносите силикон или вакуумную смазку на какие-либо части коллектора QIAvac 24 Plus.
- Всегда соблюдайте осторожность и надевайте защитные очки при работе рядом с вакуумным коллектором под давлением.
- Обратитесь в службу технической поддержки QIAGEN или к местному дистрибьютору для получения информации о запасных или сменных частях.
- Вакуумное давление - это перепад давления между внутренней частью вакуумного коллектора и атмосферой (стандартное атмосферное давление 1013 миллибар или 760 мм рт. Ст.) И могут быть измерены с помощью соединительной системы QIAvac (см. Рисунок 2). Для протоколов требуется вакуумный насос, способный создавать разрежение или от -800 до -900 мбар (например, вакуумный насос QIAGEN). Следует избегать более высокого давления вакуума. Использование вакуума ниже рекомендованного может снизить выход и чистоту нуклеиновых кислот и повысить риск засорения мембран.

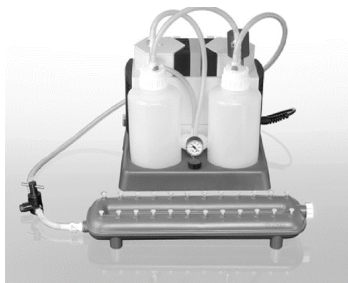


Рис. 2. QIAvac 24 Plus, система подключения QIAvac и вакуумный насос

Таблица 1. Свойства химической стойкости QIAvac 24 Plus

Устойчивы к		Не устойчив к
Уксусная кислота	Хаотропные соли	Бензол
Хромовая кислота	Концентрированные спирты	Фенол
SDS	натрия хлорид	хлороформ
Tween® 20	Мочевина	Толуол
Хлорный отбеливатель	Соляная кислота	Эфиры
Гидроксид натрия		

Настройка вакуумного коллектора QIAvac 24 Plus

1. Подключите QIAvac 24 Plus к источнику вакуума. При использовании системы подключения QIAvac подключите систему к коллектору и источнику вакуума, как описано в Приложении А Руководства QIAvac 24 Plus.
2. Вставьте VacValve (необязательно) в каждый люэровский слот QIAvac 24 Plus, который будет использоваться (см. Рисунок 3). Закройте неиспользуемые люэровские прорези люэровскими заглушками или закройте вставленный VacValve. VacValves следует использовать, если скорости потока образцов значительно различаются, чтобы гарантировать постоянный вакуум.
3. Вставьте VacConnector в каждый VacValve (см. Рисунок 3).
Выполните этот шаг непосредственно перед началом очистки, чтобы избежать контакта VacConnectors с потенциальными загрязнителями в воздухе.
4. Поместите колонки QIAamp Mini в разъемы VacConnectors на коллекторе (см. Рисунок 3).
Примечание. Сохраните промывочную трубку из блистерной упаковки для использования в протоколе очистки.
5. Вставьте удлинитель колонки (20 мл) в каждую колонку QIAamp Mini (см. Рисунок 3).
Примечание. Убедитесь, что удлинитель колонки плотно вставлен в колонку QIAamp Mini, чтобы избежать утечки пробы.
6. Для очистки нуклеиновых кислот следуйте инструкциям в протоколах.

Утилизируйте VacConnectors после использования.

Оставьте крышку колонки QIAamp Mini открытой во время создания вакуума.

Выключайте вакуум между этапами, чтобы обеспечить постоянный, равномерный вакуум во время обработки. Для более быстрого сброса вакуума следует использовать регулятор вакуума (часть соединительной системы QIAvac).

Примечание. Каждый VacValve может быть закрыт индивидуально, когда образец полностью проходит через спин-колонку, что позволяет проводить параллельную обработку образцов разного объема или вязкости.

7. После обработки образцов очистите QIAvac 24 Plus (см. «Очистка и обеззараживание QIAvac 24 Plus» в Руководстве по QIAvac 24 Plus).

Примечание. Буферы ACL, ACB и ACW1 несовместимы с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель. См. Стр. 12 с предупреждениями и мерами предосторожности.

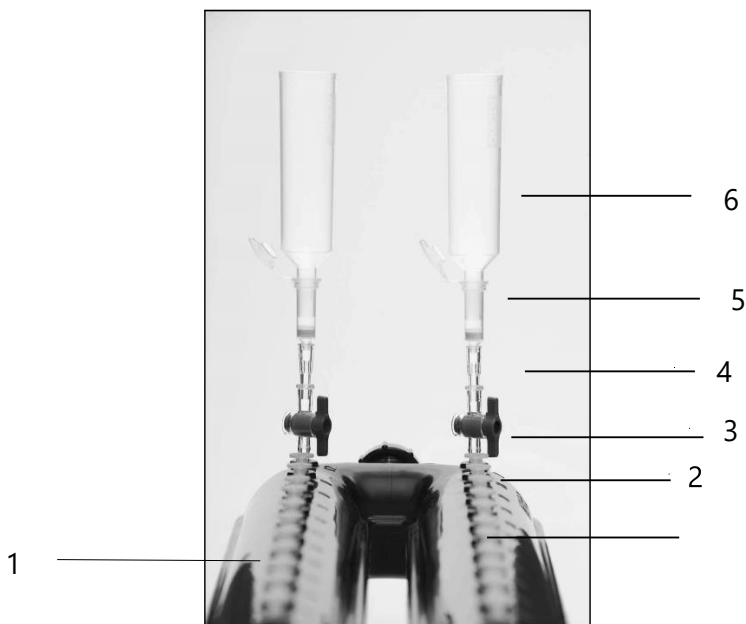
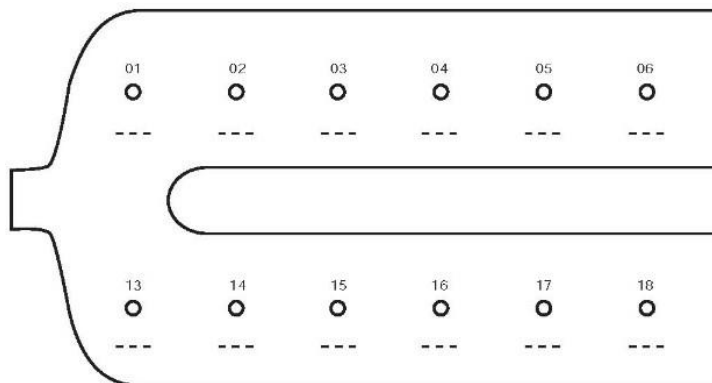


Рис. 3. Настройка QIAvac 24 Plus с колонками QIAamp Mini с использованием VacValves, VacConnectors и Column Extenders.

- | | |
|--|-------------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus вакуумный коллектор | 4 VacConnector |
| 2 Слот Люэра QIAvac 24 Plus (закрыт люэровским штекером) | 5 Колонка QIAamp Mini |
| 3 VacValve** | 6 колоночный удлинитель |

Мы рекомендуем маркировать пробирки и колонки QIAamp Mini для использования в вакуумной системе QIAvac 24 Plus в соответствии со схемой на Рисунке 4, чтобы избежать смешивания образцов. Этот рисунок можно скопировать и пометить с названиями образцов.

* Приобретается отдельно.



Дата: _____

Оператор: _____

Run ID: _____

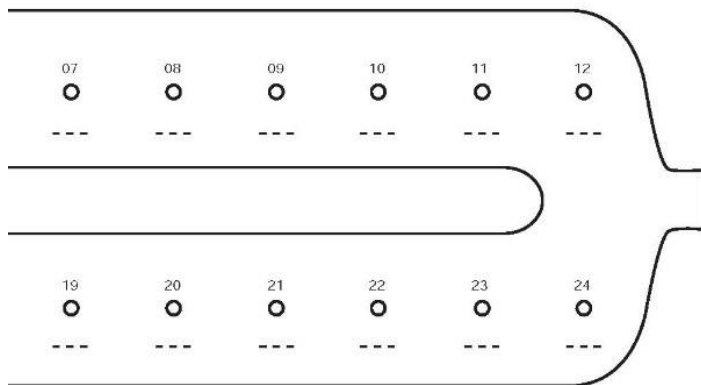


Рис. 4. Схема маркировки пробирок и колонок QIAamp Mini для использования в вакуумной системе QIAvac 24 Plus.

Приготовление буферов и реагентов

Буфер ACB

Перед использованием добавьте 200 мл изопропанола (100%) к 300 мл концентрата буфера ACB, чтобы получить 500 мл буфера ACB. Хорошо перемешайте после добавления изопропанола.

Буфер ACW1 *

Перед использованием добавьте 25 мл этанола (96–100%) к 19 мл концентрата буфера ACW1, чтобы получить 44 мл буфера ACW1. Хорошо перемешайте после добавления этанола.

Буфер ACW2 †

Перед использованием добавьте 30 мл этанола (96–100%) к 13 мл концентрата буфера ACW2, чтобы получить 43 мл буфера ACW2. Хорошо перемешайте после добавления этанола.

Добавление РНК-носителя в буфер ACL *

РНК-носитель служит двум целям: во-первых, она усиливает связывание нуклеиновых кислот с мембраной QIAamp Mini, особенно если в образце очень мало молекул-мишеней. Во-вторых, добавление больших количеств РНК-носителя снижает вероятность деградации РНК в тех редких случаях, когда молекулы РНКазы избегают денатурации хаотропными солями и детергентами в буфере ACL.

Количество предоставленной лиофилизированной РНК-носителя достаточно для объема ACL буфера, поставляемого с набором. Рекомендуемая концентрация РНК-носителя была скорректирована таким образом, чтобы протокол QIAamp DSP Circulating NA можно было использовать в качестве общей системы очистки совместимой со многими различными системами амплификации и подходит для широкого спектра мишеней РНК и ДНК.

Различные системы амплификации различаются по эффективности в зависимости от общего количества нуклеиновых кислот, присутствующих в реакции. Элюаты из набора содержат как циркулирующие нуклеиновые кислоты, так и РНК-носитель, и количество РНК-носителя в большинстве случаев значительно превышает количество циркулирующих нуклеиновых кислот. Следовательно, количественная оценка изолированных циркулирующих нуклеиновых кислот путем измерения УФ-поглощения не будет адекватной, поскольку результаты таких измерений определяются присутствием РНК-носителя.

* Содержит хаотропную соль. См. Стр. 12-13 с предупреждениями и мерами предосторожности.

† Содержит азид натрия в качестве консерванта

Для достижения наивысшего уровня чувствительности в реакциях амплификации может потребоваться уменьшить количество РНК-носителя, добавляемой в буфер ACL.

Для систем амплификации, включающих праймеры олиго dT, не следует добавлять РНК-носитель во время выделения свободно циркулирующих нуклеиновых кислот.

Добавьте 1550 мкл буфера AVE * в пробирку, содержащую 310 мкг лиофилизированной РНК-носителя, чтобы получить раствор с концентрацией 0,2 мкг / мкл. Тщательно растворите РНК-носитель, разделите на аликвоты подходящего размера и храните при температуре от –30 до –15 ° C. Не замораживайте-размораживайте аликвоты РНК-носителя более 3 раз.

Обратите внимание, что РНК-носитель не растворяется в буфере ACL. Сначала его необходимо растворить в буфере AVE, а затем добавить в буфер ACL.

Рассчитайте объем смеси буферного ACL и РНК-носителя, необходимый для каждой партии образцов, в соответствии с таблицами в протоколах. Выберите количество образцов для одновременной обработки.

Аккуратно перемешайте, перевернув пробирку или бутылку 10 раз. Чтобы избежать пенообразования, не перемешивайте.

* Содержит азид натрия в качестве консерванта.

Примечание. Процедура подготовки образца оптимизирована для содержания максимум 1,0 мкг РНК-носителя на образец. Если было показано, что меньшая РНК-носитель лучше подходит для вашей системы амплификации, перенесите только необходимое количество растворенной РНК-носителя в пробирки, содержащие буфер ACL. Для каждого микрограмма РНК-носителя, необходимого для приготовления, добавьте 5 мкл растворенной РНК-носителя в буфер ACL. (Использование менее 1,0 мкг РНК-носителя на образец может быть полезным и должно быть подтверждено для каждого конкретного типа образца и последующего анализа.)

Протокол Бриза: очистка циркулирующих нуклеиновых кислот из 1–5 мл плазмы крови человека

Этот протокол предназначен для очистки циркулирующих ДНК и РНК из 1–5 мл плазмы крови человека и оптимизирован для сокращения времени обработки и обработки. Для существующих проверенных пользователем рабочих процессов с использованием циркуляционного комплекта QIAamp DSP версии 1 / R3, пожалуйста, обратитесь к «Классическому протоколу: очистка циркулирующих нуклеиновых кислот из 1–5 мл плазмы крови человека» (стр. 32).

Важные моменты перед началом

- Все этапы центрифугирования выполняются при комнатной температуре (15–25 ° C).
- Отключите вакуум между этапами, чтобы обеспечить постоянный, равномерный вакуум во время этапов протокола.
- Примечание: давление вакуумного насоса должно быть в пределах от –800 до –900 мбар.
- Довести образцы до комнатной температуры.
- Используйте физиологический раствор с фосфатным буфером, чтобы довести объем пробы до ближайшего точного объема (от 1 мл до 5 мл).
- Настройте QIAvac 24 Plus, как описано на странице 19.
- Нагрейте водяную баню или нагревательный блок до 56 ° C для использования с 50 мл центрифужными пробирками на шаге 3.
- Перед использованием доведите спин-колонки QIAamp Mini до комнатной температуры не менее 1 часа.
- Убедитесь, что буфер ACB, буфер ACW1 и буфер ACW2 были приготовлены (добавление изопропанола или этанола) в соответствии с инструкциями на странице 24.
- Добавьте РНК-носитель, восстановленную в буфере AVE, в буфер ACL в соответствии с инструкциями в таблице 2.

Таблица 2. Объем буфера ACL и РНК-носителя (растворенной в буфере AVE), необходимый для обработки 1–5 мл образцов плазмы крови человека.

Настройки на мл плазмы	A	B	C	D	E	РНК- носитель в буфере AVE (мкл)
	1 мл	2 мл	3 мл	4 мл	5 мл	
Количество образцов	Буфер ACL (мл)					
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

Процедура: Протокол Бриза

1. Внесите пипеткой QIAGEN Proteinase K, плазму и буфер ACL в указанном порядке в центрифужную пробирку на 50 мл (не входит в комплект).

	A	B	C	D	E
ProtK (мкл)	100	200	300	400	500
Плазма (мл)	1	2	3	4	5
ACL (мл)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. Закройте крышку и перемешайте импульсным встряхиванием в течение 5 x 2 секунд.

Убедитесь, что в пробирке образуется видимый вихрь. Для обеспечения эффективного лизиса важно, чтобы образец и буфер ACL были тщательно перемешаны до получения гомогенного раствора.

Примечание: не прерывайте процедуру в это время. Сразу переходите к шагу 3, чтобы начать инкубацию лизиса.

3. Инкубируйте при 56 ° C (± 1 ° C) в течение 15 (± 1) минут.
4. Поместите пробирку обратно на лабораторный стол и отвинтите крышку.
5. Добавьте буфер ACB к лизату в пробирке. Выберите громкость в соответствии с настройками, начиная с шага 1.

	A	B	C	D	E
ACB (мл)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

6. Закройте крышку и тщательно перемешайте импульсным встряхиванием в течение 5 x 2 секунд.

Убедитесь, что в трубке образуется видимый вихрь. Для обеспечения эффективного лизиса важно, чтобы лизат и буфер ACB были тщательно перемешаны до получения гомогенного раствора.

7. Инкубируйте смесь лизата и буфера ACB в пробирке в течение 5 ($\pm$ 1) минут при комнатной температуре.

8. Вставьте колонку QIAamp Mini в разъем VacConnector на QIAvac 24 Plus (см. «Настройка вакуумного коллектора QIAvac 24 Plus», стр. 19). Вставьте расширитель колонки на 20 мл в открытую колонку QIAamp Mini.

Убедитесь, что удлинитель колонки плотно вставлен в колонку QIAamp Mini, чтобы избежать утечки пробы.

Примечание: оставьте промывочную трубку для сухого отжима на шаге 13.

9. Осторожно нанесите лизат из шага 7 в удлинитель колонки QIAamp Mini. Включите вакуумный насос. Когда все лизаты будут полностью пропущены через колонки, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар. Осторожно снимите и выбросьте удлинитель колонки.

Обратите внимание, что большие объемы лизата образца (около 18 мл при запуске с образцом 5 мл) могут потребовать до 20 минут для прохождения через мембрану QIAamp Mini под действием вакуума.

Для быстрого и удобного сброса давления вакуума следует использовать регулятор вакуума (часть соединительной системы QIAvac).

Примечание. Во избежание перекрестного загрязнения будьте осторожны, чтобы не пересекать колонки QIAamp Mini, пока удалены удлинители колонок.

10. Нанесите 600 мкл буфера ACW1 на колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как весь буфер ACW1 будет пропущен через колонку QIAamp Mini, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар.

11. Нанесите 750 мкл буфера ACW2 на колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как весь буфер ACW2 будет пропущен через колонку QIAamp Mini, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар.

12. Нанесите 750 мкл этанола (96–100%) в колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как весь этанол будет пропущен через спин-колонку, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар.

13. Закройте крышку колонки QIAamp Mini. Снимите его с вакуумного коллектора и выбросьте VacConnector. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую промывную пробирку объемом 2 мл (из шага 8) и центрифугируйте на полной скорости (20 000 x g; 14 000 об / мин) в течение 3 ($\pm$ 0,5) минут.

14. Поместите колонку QIAamp Mini в новую промывную пробирку на 2 мл. Откройте крышку и инкубируйте сборку при комнатной температуре в течение 3 минут, чтобы полностью высушить мембрану.

15. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую элюирующую пробирку на 1,5 мл (входит в комплект) и выбросьте 2 мл промывочную пробирку из шага 14. Осторожно нанесите 20–150 мкл буфера AVE в центр мембраны колонки QIAamp Mini. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре в течение 3 ($\pm$ 0,5) минут.

Важно: убедитесь, что буфер для элюирования AVE уравновешен до комнатной температуры (15-25 ° C). Если элюирование проводится в малых объемах (<50 мкл), буфер для элюции необходимо распределить по центру мембраны для полного элюирования связанных нуклеиновых кислот. Объем элюирования является гибким и может быть адаптирован в соответствии с требованиями последующих приложений. Элюция меньшими объемами буфера AVE приводит к более высоким концентрациям нуклеиновых кислот, но может привести к более низкому общему выходу. Объем извлеченного элюата может быть на 5 мкл меньше объема элюирования, нанесенного на мембрану колонки QIAamp Mini.

Примечание. При ожидаемых низких выходах NA для элюирования рекомендуется использовать пробирку с низким связыванием (не входит в комплект).

16. Центрифуга в микроцентрифуге на полной скорости (20 000 x g; 14 000 об / мин) в течение 1 минуты для элюирования нуклеиновых кислот.

Классический протокол: очистка

циркулирующих нуклеиновых кислот из 1–5

мл плазмы крови человека

Этот протокол продолжает неизменный протокол QIAamp DSP circulating NA Kit Handbook Revision 3 (R3) для использования, например, с существующими утвержденными пользователем рабочими процессами для 1-5 мл плазмы крови человека.

- Важные моменты перед началом
- Все этапы центрифугирования выполняются при комнатной температуре (15–25 ° C).
- Отключите вакуум между этапами, чтобы обеспечить постоянный, равномерный вакуум во время этапов протокола.
- Примечание. Давление вакуумного насоса должно составлять от –800 до –900 мбар.
- Довести образцы до комнатной температуры.
- Используйте физиологический раствор с фосфатным буфером, чтобы довести объем пробы до ближайшего точного объема (от 1 мл до 5 мл).
- Настройте QIAvac 24 Plus, как описано на странице 19.
- Нагрейте водяную баню или нагревательный блок до 60 ° C для использования с 50 мл центрифужными пробирками на шаге 3.
- Нагрейте нагревательный блок до 56 ° C для использования с промывными пробирками объемом 2 мл на шаге 14.
- Перед использованием доведите спин-колонки QIAamp Mini как минимум за 1 час до комнатной температуры.
- Убедитесь, что буфер ACB, буфер ACW1 и буфер ACW2 были приготовлены (добавление изопропанола или этанола) в соответствии с инструкциями на странице 24.
- Добавьте РНК-носитель, восстановленную в буфере AVE, в буфер ACL в соответствии с инструкциями в таблице 3.

Таблица 3. Объем буфера ACL и РНК-носителя (растворенной в буфере AVE), необходимый для обработки 1–5 мл образцов плазмы крови человека.

Настройки на мл плазмы	A	B	C	D	E	РНКноситель в буфере AVE(мкл)
	1 мл	2 мл	3 мл	4 мл	5 мл	
Количество образцов	Buffer ACL (мл)					
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

Процедура: классический протокол

1. Внесите пипеткой QIAGEN Proteinase K, плазму и буфер ACL в указанном порядке в центрифужную пробирку на 50 мл (не входит в комплект). QIAGEN Proteinase K, plasma, and Buffer ACL in this order into a 50 ml centrifuge tube (not provided).

	A	B	C	D	E
ProK (мкл)	100	200	300	400	500
Плазма (мл)	1	2	3	4	5
ACL (мл)	0.8	1.6	2.4	3.2	4

2. Закройте крышку и перемешайте импульсным встряхиванием в течение 30 секунд.
3. Убедитесь, что в трубке образуется видимый вихрь. Для обеспечения эффективного лизиса важно, чтобы образец и буфер ACL были тщательно перемешаны до получения гомогенного раствора.
4. Примечание: не прерывайте процедуру в это время. Сразу переходите к шагу 3, чтобы начать инкубацию лизиса.
5. Инкубируйте при 60 ° C (± 1 ° C) в течение 30 (± 2) минут.
6. Поместите пробирку обратно на лабораторный стол и отвинтите крышку.
7. Добавьте буфер ACB к лизату в пробирке. Выберите громкость в соответствии с настройками, начиная с шага 1.

	A	B	C	D	E
ACB (мл)	1.8	3.6	5.4	7.2	9

8. Закройте крышку и тщательно перемешайте импульсным встряхиванием в течение 30 секунд.
9. Убедитесь, что в трубке образуется видимый вихрь. Для обеспечения эффективного лизиса важно, чтобы лизат и буфер ACB были тщательно перемешаны до получения гомогенного раствора.

10. Инкубируйте смесь лизата и буфера ACB в пробирке в течение 5 ($\pm$ 1) минут на льду.
11. Вставьте колонку QIAamp Mini в разъем VacConnector на QIAvac 24 Plus (см. «Настройка вакуумного коллектора QIAvac 24 Plus», стр. 19). Вставьте расширитель колонки на 20 мл в открытую колонку QIAamp Mini.
12. Убедитесь, что удлинитель колонки плотно вставлен в колонку QIAamp Mini, чтобы избежать утечки пробы.

Примечание: оставьте промывочную трубку для сухого отжима на шаге 13.

13. Осторожно нанесите лизат из шага 7 в удлинитель колонки QIAamp Mini. Включите вакуумный насос, создав давление от –800 до –900 мбар. Когда все лизаты будут полностью пропущены через колонки, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар. Осторожно снимите и выбросьте удлинитель колонки.
14. Обратите внимание, что большие объемы лизата образца (около 18 мл при запуске с образцом 5 мл) могут потребовать до 20 минут для прохождения через мембрану QIAamp Mini под действием вакуума.
15. Для быстрого и удобного сброса давления вакуума следует использовать регулятор вакуума (часть соединительной системы QIAvac).

Примечание. Во избежание перекрестного загрязнения будьте осторожны, чтобы не пересекать колонки QIAamp Mini, пока удалены удлинители колонок.

16. Нанесите 600 мкл буфера ACW1 на колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как весь буфер ACW1 будет пропущен через колонку QIAamp Mini, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар.
17. Нанесите 750 мкл буфера ACW2 на колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как весь буфер ACW2 будет пропущен через колонку QIAamp Mini, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар.
18. Нанесите 750 мкл этанола (96–100%) на колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как весь этанол будет пропущен через спин-колонку, выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 мбар.
19. Закройте крышку колонки QIAamp Mini. Снимите его с вакуумного коллектора и выбросьте VacConnector. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую промывную пробирку объемом 2 мл (из шага 8) и центрифугируйте на полной скорости (20000 x g; 14000 об / мин) для 3 ($\pm$ 0,5) минуты.

20. Поместите колонку QIAamp Mini в новую промывную пробирку на 2 мл. Откройте крышку и инкубируйте сборку при 56 ° C (± 1 ° C) в течение 10 (± 1) минут, чтобы полностью высушить мембрану.
21. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую элюирующую пробирку на 1,5 мл (входит в комплект) и выбросьте 2 мл промывочную пробирку из шага 13. Осторожно нанесите 20–150 мкл буфера AVE в центр мембраны колонки QIAamp Mini. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре в течение 3 ($\pm 0,5$) минут.

Важно: убедитесь, что буфер для элюирования AVE уравновешен до комнатной температуры (15-25 ° C). Если элюирование проводится в малых объемах (<50 мкл), буфер для элюции необходимо распределить по центру мембраны для полного элюирования связанных нуклеиновых кислот.

22. Объем элюирования является гибким и может быть адаптирован в соответствии с требованиями последующих приложений. Элюция меньшими объемами буфера AVE приводит к более высоким концентрациям нуклеиновых кислот, но может привести к более низкому общему выходу. Объем извлеченного элюата может быть на 5 мкл меньше объема элюирования, нанесенного на колонку QIAamp Mini.

Примечание. При ожидаемых низких выходах NA для элюирования рекомендуется использовать пробирку с низким связыванием (не входит в комплект).

23. Центрифуга в микроцентрифуге на полной скорости (20 000 x g; 14 000 об / мин) в течение 1 минуты для элюирования нуклеиновых кислот

Контроль качества

В соответствии с сертифицированной ISO системой управления качеством QIAGEN каждая партия наборов QIAamp DSP Circulating NA тестируется на соответствие заранее определенным спецификациям для обеспечения стабильного качества продукции.

Ограничения

Производительность системы для выделения циркулирующих бесклеточных нуклеиновых кислот была установлена с использованием образцов плазмы человека, полученных из следующих пробирок для забора крови:

- K2-EDTA (Beckton Dickinson, кат. № 367525)
- PAXgene Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, кат. № 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, кат. № 218962)

Чтобы свести к минимуму риск негативного воздействия на результаты диагностики, следует использовать соответствующие средства контроля для последующих приложений. Для дальнейшей валидации рекомендуются руководящие принципы Международной конференции по гармонизации технических требований (ICH) в ICH Q2 (R1) «Валидация аналитических процедур: испытания и методология».

Любые полученные диагностические результаты должны интерпретироваться вместе с другими клиническими или лабораторными данными.

Символы

Символ	Обозначение символа
	Содержит реагенты, достаточные для <N> тестов
	Использовать в
	Медицинское устройство для диагностики in vitro
	По прибытии
	Открыть при доставке; хранить колонки QIAamp Mini Spin при 2–8 ° C.
	Каталожный номер
	Число
	Номер лота
	Номер материала
	Компоненты
	Объем
	Добавление
	Ограничение температуры

	Производитель
	Проконсультируйтесь с инструкциями по применению.
	Запишите текущую дату после добавления этанола в бутылку.
	Спирт этиловый
	Запишите текущую дату после добавления изопропанола в бутылку.
	Изопропанол
	Содержит
	Приводит к
	Гуанидин тиоцианат
	Гуанидин гидрохлорид
	BRIJ 58
	Глобальный номер предмета торговли

Ссылки на использованные источники

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.

Контактная информация

Для получения технической поддержки и получения дополнительной информации посетите наш Центр технической поддержки по адресу support.qiagen.com или позвоните в один из отделов технического обслуживания QIAGEN или у местных дистрибьюторов (см. Заднюю обложку или посетите сайт www.qiagen.com).

Руководство по устранению неполадок

Это руководство по устранению неполадок может оказаться полезным при решении любых проблем, которые могут возникнуть. Контактную информацию см. На задней обложке или посетите сайт www.qiagen.com.

Комментарии и предложения

Мало или совсем нет нуклеиновой кислоты в элюате

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Использование нестабилизированной плазмы | Нестабилизированные образцы плазмы могут привести к ускоренной деградации ДНК. Мы рекомендуем следовать CEN / TS 16835-3: 2015. Повторите процедуру очистки с новыми образцами. |
| b) | Увеличенное время между взятием крови и подготовкой плазмы | Ядерные клетки крови могут распадаться и высвобождать геномную ДНК в плазму, разбавляя целевую нуклеиновую кислоту. |
| c) | Образцы замораживаются и размораживаются более одного раза | Следует избегать повторного замораживания и оттаивания, так как это может привести к деградации ДНК. Всегда используйте свежие образцы или образцы, размороженные только один раз. |
| d) | Низкая концентрация целевой ДНК в образцах | Образцы плазмы слишком долго оставляли стоять при комнатной температуре. Повторите процедуру очистки с новыми образцами.

Примечание: у некоторых людей концентрация внеклеточной НА в плазме может быть низкой; здесь следует выбирать увеличенный объем образца и низкий объем элюата. |
| e) | Неэффективный лизис образца в буферном ACL | Если QIAGEN Proteinase K подвергалась воздействию повышенной температуры в течение длительного времени, она может потерять активность. Повторите процедуру, используя новые образцы и свежую протеиназу QIAGEN. |
| f) | Смесь буферного ACL и РНК-носителя недостаточно перемешана | Смешайте буфер ACL с РНК-носителем, осторожно перевернув пробирку с буфером ACL— РНК-носитель не менее 10 раз. |
| g) | Используется низкопроцентный этанол вместо 96–100%. | Повторите процедуру очистки с новыми образцами и 96–100% этанолом. Не используйте денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон. |
| h) | Буфер ACB подготовлен неправильно | Убедитесь, что концентрат буфера ACB был восстановлен правильным объемом изопропанола (не этанола, см. Стр. 24). |
| i) | Буфер ACW1 или буфер ACW2 подготовлен неправильно | Убедитесь, что концентраты буфера ACW1 и буфера ACW2 разбавлены правильным объемом этанола (см. Стр. 24). Повторите процедуру очистки с новыми образцами. |
| j) | Буфер ACW1 или буфер ACW2, приготовленный с 70% этанолом | Убедитесь, что концентраты буфера ACW1 и буфера ACW2 разбавлены 96–100% этанолом (см. Стр. 24). Повторите процедуру очистки с новыми образцами. |

ДНК или РНК плохо работают в последующих ферментативных реакциях.

- | | | |
|----|----------------------------------|---|
| a) | Мало или совсем нет ДНК в элюате | См. Возможные причины в разделе «Мало нуклеиновой кислоты в элюате или ее отсутствие» выше. Если возможно, увеличьте количество элюата, добавляемого в реакцию. |
|----|----------------------------------|---|

Комментарии и предложения

- b) Несоответствующий объем элюирования использовался
- Определите максимальный объем элюата, подходящий для вашего нисходящего потока.
- заявление. Соответственно уменьшите или увеличьте объем элюата, добавляемого к последующему применению. Объем элюирования можно регулировать пропорционально.
- Примечание. Элюция меньшими объемами буфера AVE приводит к более высоким концентрациям нуклеиновых кислот, но может привести к более низкому общему выходу.
- c) Буферы не перемешаны тщательно
- Солевые и этанольные компоненты промывочного буфера ACW2 могли отделиться после длительного отстаивания между циклами. Всегда тщательно перемешивайте буферы перед каждым запуском.
- d) Интерференция из-за РНК-носителя
- Если присутствие РНК-носителя в элюате мешает последующей ферментативной реакции, может потребоваться уменьшить количество РНК-носителя или вообще исключить ее.

Общее обращение

- a) Забита колонка QIAamp Mini
- Если скорость потока уменьшается, время вакуумирования может быть увеличено.
- В качестве альтернативы закройте VacValve, если он используется, и осторожно извлеките узел удлинитель колонки – VacConnector – VacValve из колонки QIAamp Mini без потери лизата в удлинителе колонки.
- Снимите колонку QIAamp Mini с вакуумного коллектора, поместите ее в промывную пробирку объемом 2 мл и вращайте на полной скорости, пока образец полностью не пройдет через мембрану. Замените узел удлинитель колонки – VacConnector – VacValve, содержащий оставшийся лизат. Включите вакуумный насос, откройте VacValve и продолжайте загружать оставшийся лизат.
- Повторите описанную выше процедуру, если мини-колонка QIAamp продолжает засоряться.
- Криопреципитаты могли образоваться в плазме из-за многократного замораживания и оттаивания. Они могут заблокировать колонку QIAamp Mini. Не используйте замороженную и размороженную плазму более одного раза.
- Если криопреципитаты видны, очистите образец центрифугированием в течение 5 минут при 16000 x g.
- b) Различные объемы элюирования
- Различные образцы могут влиять на объем конечного элюата. Объем извлеченного элюата может быть на 5 мкл меньше объема элюирования, нанесенного на колонку QIAamp Mini.
- c) Давление вакуума от –800 до –900 мбар не достигнуто
- Вакуумный коллектор закрыт неплотно. После включения вакуума нажмите на крышку вакуумного коллектора. Проверьте, достигается ли вакуумное давление. Изношена прокладка крышки QIAvac. Визуально проверьте уплотнение коллектора и при необходимости замените его.
- Изношены клапаны VacValves. Снимите все VacValves и вставьте VacConnectors непосредственно в люэровские удлинители. Вставьте колонки QIAamp Mini в VacConnectors, закройте крышку колонок и включите вакуум. Проверьте, достигается ли вакуумное давление. При необходимости замените VacValves.
- Негерметичное соединение с вакуумным насосом. Закройте все люэровские удлинители люэровскими колпачками и включите вакуумный насос. Убедитесь, что давление вакуума стабильно после включения насоса (и закрытия клапана регулятора вакуума). При необходимости замените соединения между насосом и вакуумным коллектором.
- Если вакуумное давление по-прежнему не достигается, замените вакуумный насос на более мощный.

Приложение А: Рекомендации по разделению и хранению плазмы крови

При использовании пробирок для сбора стабилизирующей крови (например, пробирки с вкфДНК PAXgene или пробирки Streck Cell-Free DNA) следуйте инструкциям производителя по разделению и хранению плазмы. Мы рекомендуем проверять эти условия хранения в сочетании с вашим конкретным последующим приложением и целью.

Для нестабилизированного ВСТ мы рекомендуем следовать CEN / TS 16835-3: 2015.

Чтобы изолировать циркулирующие бесклеточные нуклеиновые кислоты из образцов крови, мы рекомендуем следовать этому протоколу, который включает этап центрифугирования с высокой перегрузкой для удаления клеточного мусора, тем самым уменьшая количество клеточной или геномной ДНК и РНК в образцах крови. образец.

1. Поместите цельную кровь с ЭДТА в пробирки BD Vacutainer® (или другие пробирки с первичной кровью, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта) в центрифугу, охлаждаемую до 4 ° C, с откидным ротором и соответствующими ведрами.
2. Центрифугируйте образцы крови в течение 10 минут при 1900 x g (3000 об / мин) при 4 ° C.
3. Осторожно аспирируйте надосадочную жидкость плазмы, не нарушая межклеточный слой плазмы. Из одной пробирки для первичной крови на 10 мл можно получить около 4–5 мл плазмы.

Примечание. На этом этапе для экстракции циркулирующих нуклеиновых кислот можно использовать плазму. Однако последующее высокоскоростное центрифугирование удалит дополнительный клеточный дебрис и загрязнение циркулирующих нуклеиновых кислот геномной ДНК и РНК, полученными из поврежденных ядродержащих клеток крови.

4. Аспирированная плазма переносится в свежую центрифужную пробирку.
5. Центрифугируйте образцы плазмы в течение 10 минут при 16000 x g (в роторе с фиксированным углом) при 4 ° C. Это удалит дополнительные клеточные нуклеиновые кислоты, прикрепленные к клеточному мусору.

-
6. Осторожно удалите супернатант и перенесите в новую пробирку, не трогая осадок.
 7. Если плазма будет использована для экстракции нуклеиновой кислоты в тот же день, храните ее при 2–8 °С до дальнейшей обработки. Для более длительного хранения аликвоты плазмы как из стабилизированных, так и из нестабилизированных пробирок для забора крови могут храниться при –20°C (ДНК как мишень) или –80°C (РНК как мишень) не менее 4 недель. Перед использованием плазмы для экстракции циркулирующих нуклеиновых кислот разморозьте пробирки с плазмой при комнатной температуре.
 8. Необязательно: для удаления криопреципитатов центрифугируйте образцы плазмы в течение 5 минут при 16000 x g (в роторе с фиксированным углом).
Необязательно: перенесите супернатант в новую пробирку и затем начните с протокола экстракции циркулирующих нуклеиновых кислот.

Приложение В: Общие замечания по обращению с РНК

Работа с РНК

Рибонуклеазы (РНКа́зы) - очень стабильные и активные ферменты, для функционирования которых обычно не требуются кофакторы. Поскольку РНКа́зы трудно инактивировать, и даже незначительных количеств достаточно для разрушения РНК, не используйте пластиковую или стеклянную посуду без предварительного устранения возможного загрязнения РНКа́зой. Следует проявлять большую осторожность, чтобы избежать случайного введения РНКа́з в образец РНК во время или после процедуры очистки. Чтобы создать и поддерживать среду, свободную от РНКа́зы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности во время предварительной обработки и использования одноразовых и многоразовых сосудов и растворов при работе с РНК.

Общее обращение

При работе с РНК всегда следует использовать надлежащие микробиологические и асептические методы. Руки и частицы пыли могут переносить бактерии и плесень и являются наиболее частыми источниками загрязнения РНКа́зой. Всегда надевайте латексные или виниловые перчатки при работе с реагентами и образцами РНК, чтобы предотвратить загрязнение РНКа́зой с поверхности кожи или от пыльного лабораторного оборудования. Часто меняйте перчатки и по возможности держите пробирки закрытыми. Храните очищенную РНК на льду при переносе аликвот для последующих применений.

Одноразовая посуда

На протяжении всей процедуры рекомендуется использовать стерильные одноразовые полипропиленовые пробирки, не содержащие РНКа́зы.

Информация для заказа

Продукт	СОДЕРЖАНИЕ	Кат.№
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Для 50 препаратов: колонки QIAamp Mini, удлинители колонок, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, реагенты, буферы и пробирки для сбора	61504
Аксессуары		
Вакуумный коллектор QIAvac 24 Plus *	Вакуумный коллектор для обработки 1–24 спин-колонок: вакуумный коллектор QIAvac 24 Plus, люэровские заглушки и быстроразъемные соединения	19413
Вакуумный насос*	Универсальный вакуумный насос	84010 [США и Канада]] 84000 [Япония] 84020
Система подключения QIAvac *	Система для соединения вакуумного коллектора с вакуумным насосом: включает лоток, емкости для отходов, трубки, муфты, клапан, манометр и 24 вакуумных клапана	19419

* Для использования с протоколами вакуума.

Актуальную информацию о лицензировании и заявления об отказе от ответственности для конкретных продуктов см. В соответствующем руководстве по набору QIAGEN или руководстве пользователя. Справочники комплектов QIAGEN и руководства пользователя доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены в службе технической поддержки QIAGEN или у местного дистрибьютора.

История редакций справочника

Дата	Изменения
R4 09/2019	Изменение целевого использования на бесклеточные нуклеиновые кислоты только из плазмы человека. Включение протокола «Бриз». Протоколы для мочи и miRNA не включены. Обновление информации по безопасности.

Ограниченное лицензионное соглашение для QIAamp DSP Circulating NA Kit

Использование этого продукта означает согласие любого покупателя или пользователя продукта со следующими условиями:

1. Продукт можно использовать исключительно в соответствии с протоколами, прилагаемыми к продукту, и данным руководством, а также для использования с компонентами, входящими в комплект. QIAGEN не предоставляет лицензию в рамках какой-либо своей интеллектуальной собственности на использование или включение прилагаемых компонентов этого набора с любыми компонентами, не включенными в этот набор, за исключением случаев, описанных в протоколах, поставляемых с продуктом, в этом руководстве и дополнительных протоколах, доступных на сайте www.qiagen.com. Некоторые из этих дополнительных протоколов были предоставлены пользователями QIAGEN для пользователей QIAGEN. Эти протоколы не были тщательно протестированы и оптимизированы QIAGEN. QIAGEN не гарантирует их и не гарантирует, что они не нарушают права третьих лиц.
2. За исключением явно указанных лицензий, QIAGEN не дает никаких гарантий, что этот комплект и / или его использование (я) не нарушают права третьих лиц.
3. Этот комплект и его компоненты лицензированы для одnorазового использования и не могут быть повторно использованы, восстановлены или перепроданы.
4. QIAGEN прямо отказывается от любых других лицензий, явных или подразумеваемых, кроме явно заявленных.
5. Покупатель и пользователь набора соглашаются не предпринимать и не разрешать кому-либо предпринимать какие-либо действия, которые могут привести или способствовать любым действиям, запрещенным выше. QIAGEN может обеспечить соблюдение запретов настоящего Соглашения с ограниченной лицензией в любом суде и возместит все свои следственные и судебные издержки, включая гонорары адвокатов, в любых действиях по обеспечению соблюдения настоящего Соглашения с ограниченной лицензией или любых своих прав интеллектуальной собственности, связанных с комплектом и / или его компоненты.

Обновленные условия лицензии см. На сайте www.qiagen.com.

Торговые марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.). Зарегистрированные имена, товарные знаки и т. Д., Используемые в этом документе, даже если они специально не отмечены как таковые, не должны считаться незащищенными по закону.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, все права защищены.

Заказ www.qiagen.com/shop | Техническая поддержка support.qiagen.com | Сайт www.qiagen.com

Руководство по использованию набора QIAamp® DSP Virus Spin Kit

Версия 1

Для диагностики *in vitro*



61704



1062686EN



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

GERMANY

R6



1062686EN



Технологии пробоподготовки и анализа QIAGEN

QIAGEN является ведущим поставщиком инновационных технологий проб и анализа, позволяющих работать с содержимым любого биологического образца. Наши передовые, высококачественные продукты и услуги гарантируют успех от образца к результату.

QIAGEN устанавливает стандарты в таких сферах, как:

- Очистка ДНК, РНК и белков
- Анализ нуклеиновых кислот и белков
- исследование микроРНК и РНК
- Автоматизация проб и технологий анализа

Наша миссия - помочь вам добиться выдающихся успехов и прорывов. Для получения дополнительной информации посетите www.qiagen.com.

Содержание

Назначение	4
Пояснения	4
Принципы процедуры	4
Автоматизация на QIAcube	5
РНК-носитель	9
Состав набора	10
Материалы, предоставляемые пользователем	11
Меры предосторожности	12
Условия транспортировки и хранения реагентов	14
Условия транспортировки и хранения образцов	14
Процедура	15
Протокол: Очистка вирусных нуклеиновых кислот из плазмы или сыворотки	20
Контроль качества	23
Ограничения	23
Заявленные характеристики	23
Источники	23
Символы	24
Контактная информация	25
Приложение	26

Назначение

QIAamp DSP Virus Spin Kit - это система, в которой используется технология кремнеземных мембран (технология QIAamp) для выделения и очистки вирусных нуклеиновых кислот из биологических образцов.

Продукт предназначен для использования профессиональными пользователями, такими как техники и врачи, которые обучены молекулярно-биологическим методам. Набор QIAamp DSP Virus Spin предназначен для диагностики *in vitro*.

Пояснения

В QIAamp DSP Virus Spin Kit используется хорошо зарекомендовавшая себя технология для одновременной очистки вирусной ДНК и РНК. Набор объединяет свойства селективного связывания мембраны на основе диоксида кремния с гибкими объемами элюирования от 20 до 150 мкл. Процедура подходит для использования с плазмой и сывороткой. Образцы могут быть свежими или замороженными при условии, что они не были заморожены и оттаяли более одного раза. Вирусные нуклеиновые кислоты элюируются в буфере AVE, готовые для использования в реакциях амплификации или хранения при температуре от –25 до –15°C.

Принципы процедуры

Процедура QIAamp DSP Virus Spin состоит из 4 этапов (лизирование, связывание, промывание, элюирование) и выполняется с использованием колонок QIAamp MinElute® в стандартной микроцентрифуге или полностью автоматизирована на QIAcube®. Процедура разработана таким образом, чтобы свести к минимуму вероятность перекрестного загрязнения между образцами и обеспечить безопасное обращение с потенциально инфекционными образцами. Простая процедура QIAamp DSP Virus Spin подходит для одновременной обработки нескольких образцов. QIAamp DSP Virus Spin Kit можно использовать для выделения вирусной РНК и ДНК из широкого спектра вирусов РНК и ДНК. Однако рабочие характеристики для каждого вида вирусов не установлены и должны быть подтверждены пользователем.

Автоматизация на QIAcube

Очистка вирусных нуклеиновых кислот может быть полностью автоматизирована на QIAcube. Инновационный QIAcube использует передовые технологии для обработки спиновых колонок QIAGEN, обеспечивая бесшовную интеграцию автоматизированной подготовки проб с низкой производительностью в рабочий процесс вашей лаборатории. Приготовление образца с использованием QIAcube выполняется так же, как и ручная процедура (то есть лизирование, связывание, промывание и элюирование), что позволяет вам продолжать использовать QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit для очистки высококачественной ДНК.

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре см. Соответствующий лист протокола, доступный по адресу www.qiagen.com/MyQIAcube. Актуальные листы протоколов можно скачать бесплатно или получить, связавшись с отделом технического обслуживания QIAGEN.

При автоматизации набора QIAamp DSP Virus Spin Kit на приборе QIAcube прибор может обработать менее 50 образцов из-за мертвых объемов, испарения и дополнительного расхода реагента с помощью автоматического пипетирования. QIAGEN гарантирует только 50 образцов образцов с ручным использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit.



Рисунок 1 QIAcube

Лизис с протеазой QIAGEN

Образцы лизируют в условиях высокой денатурирования при повышенных температурах. Лизис проводят в присутствии протеазы QIAGEN и буфера AL, которые вместе обеспечивают инактивацию РНКаз.

Адсорбция на мембране QIAamp MinElute

Условия связывания корректируют путем добавления этанола, чтобы обеспечить оптимальное связывание вирусной РНК и ДНК с мембраной. Затем лизаты переносят на колонку QIAamp MinElute, и вирусные нуклеиновые кислоты адсорбируют на силикагелевой мембране, когда лизат пропускают центрифугированием. Соли и pH гарантируют, что белок и другие загрязнители, которые могут ингибировать ПЦР и другие последующие ферментативные реакции, не останутся на мембране QIAamp MinElute. Промывочные пробирки объемом 2 мл (входят в комплект) поддерживают колонку QIAamp MinElute во время загрузки и промывки.

Удаление остаточных загрязнений

Нуклеиновые кислоты остаются связанными с мембраной, в то время как загрязняющие вещества эффективно смываются за 3 этапа отмытки. За одну стадию высокочистые вирусные РНК и ДНК элюируются в буфере AVE, доведенном до комнатной температуры.

Элюция чистых нуклеиновых кислот

Элюция выполняется с использованием буфера AVE. Колонки QIAamp MinElute позволяют минимальные объемы элюирования всего 20 мкл. Низкий объем элюирования приводит к высококонцентрированным элюатам нуклеиновых кислот.

Для последующих применений, которые требуют небольших начальных объемов (ПЦР и ОТ-ПЦР), более концентрированный элюат может повысить чувствительность анализа.

Для последующих применений, где требуется больший начальный объем, объем элюции можно увеличить до 150 мкл. Однако увеличение объема элюирования приведет к снижению концентрации нуклеиновых кислот в элюате. Извлеченный объем элюата может быть на 5 мкл меньше объема буфера для элюции, нанесенного на колонку; например, объем буфера для элюции 20 мкл

приводит к > 15 мкл конечного элюата. Объем извлеченного элюата зависит от природы образца.

Элюированную нуклеиновую кислоту собирают в 1,5 мл элюирующие пробирки (ЕТ). Рекомендуется хранение ДНК или РНК при –20°C.

Выходы вирусной нуклеиновой кислоты, выделенной из биологических образцов, обычно ниже 1 мкг. Количественные методы амплификации рекомендуются для определения выхода. При количественном определении нуклеиновых кислот, выделенных с использованием протокола QIAamp DSP Virus Spin, помните, что в образце будет значительно больше РНК-носителя, чем вирусной РНК.

Процедура экстракции

образец



лизис



связывание



отмывка 1



отмывка 2



отмывка
(спинт)



прокрутка
насухо



элюция



Очищенные вирусные НК

РНК-носитель

РНК-носитель служит двум целям: во-первых, он усиливает связывание вирусных нуклеиновых кислот с мембраной QIAamp, особенно если в образце очень мало молекул-мишеней. Во-вторых, добавление большого количества РНК-носителя снижает вероятность деградации вирусной РНК в редком случае, когда молекулы РНКазы избегают денатурации с помощью хаотропных солей и детергента в буфере AL. Если РНК-носитель не добавляется в буфер AL, это может привести к снижению вирусной РНК или восстановлению ДНК.

Различные системы амплификации различаются по эффективности в зависимости от общего количества нуклеиновой кислоты, присутствующей в реакции. Элюаты из этого набора содержат как вирусные нуклеиновые кислоты, так и РНК-носитель, и количество РНК-носителя будет значительно превышать количество вирусных нуклеиновых кислот. Поэтому расчеты количества элюата, добавляемого в последующие амплификации, должны основываться на количестве РНК-носителя. Чтобы получить наивысшие уровни чувствительности в реакциях амплификации, может быть необходимо отрегулировать количество РНК-носителя, добавленной к буферу AL.

Добавление внутреннего контроля

Использование протокола QIAamp DSP Virus Spin в сочетании с коммерчески доступными тест-системами может потребовать введения внутреннего контроля в процедуру очистки. РНК или ДНК внутреннего контроля следует добавлять вместе с РНК-носителем в буфер для лизиса. Для оптимальной эффективности очистки молекулы внутреннего контроля должны быть длиннее 200 нуклеотидов, так как меньшие молекулы не могут быть эффективно восстановлены. Обратитесь к инструкциям производителя, чтобы определить оптимальную концентрацию. Использование концентрации, отличной от рекомендуемой, может снизить эффективность амплификации.

Состав набора

Набор реагентов Qiaamp DSP Virus Spin Kit		(50)
Каталожный номер		61704
Количество образцов		50*
	Состав	Количество
Qiaamp MinElute	Спин-колонки, каждая в пробирке для сбора образца	50
LT	Лизисные пробирки 2 мл	
ET	Элюирующие пробирки 1,5 мл	50
WT	Отмывочные пробирки 2мл	5x50
AL	Лизисный буфер†	33 мл
AW1	Концентрат отмывочного буфера 1†	19 мл
AW2	Концентрат отмывочного буфера 2†	13 мл
AVE	Буфер для элюции†	4x2 мл
Carrier	Носитель РНК (красные крышки)	310 мкг
PS	Растворитель протеазы†	2 мл
QP	Протеаза	1 пробирка
	Руководство пользователя	1 шт

* Содержит хаотропную соль. Примите соответствующие меры безопасности и надевайте перчатки при работе. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель.

† Содержит азид натрия в качестве консерванта.

‡ См. «Подготовка реагентов и буферов»

§ При автоматизации набора QIAamp DSP Virus Spin на инструменте QIAcube прибор может обработать менее 50 образцов из-за мертвых объемов, испарения и дополнительного расхода реагента с помощью автоматического пипетирования. QIAGEN гарантирует только 50 образцов препаратов при ручном использовании комплекта QIAamp DSP Virus Spin.

Материалы, предоставляемые пользователем

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

- Этанол (96–100%) *
- Наконечники
- Нагревательный блок для лизиса образцов при 56°C
- Микроцентрифуга (с ротором на 1,5 мл и 2 мл пробирки)
- Вортекс
- Для образцов < 200 мкл: 0,9% раствор NaCl

Меры предосторожности

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety , где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буфер для лизиса (AL) и промывочный буфер 1 (AW1) содержат гидрохлорид гуанидина, который может образовывать высокореактивные соединения в сочетании с отбеливателем. Если жидкость, содержащая эти буферы, пролилась, очистите ее подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия. Если буферные бутылки повреждены или протекают, при выбрасывании бутылок надевайте перчатки и защитные очки, чтобы избежать травм.

QIAGEN не проверял жидкие отходы, генерируемые QIAamp DSP Virus для остаточных инфекционных материалов. Загрязнение жидких отходов остаточными инфекционными материалами маловероятно, но не может быть полностью исключено. Таким образом, жидкие отходы должны считаться инфекционными и должны обрабатываться и выбрасываться в соответствии с местными правилами техники безопасности.

Следующие утверждения касаются компонентов набора

Буфер AL



Содержит: гуанидин гидрохлорид; малеиновая кислота
Предупреждение! Может быть вредным при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Может вызывать аллергическую кожную реакцию. Вызывает серьезное раздражение глаз. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Буфер AW1



Содержит: гидрохлорид гуанидина. Предупреждение! Вреден при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Протеиназа QIAGEN



Содержит: субтилизин. Опасность! Вред при проглатывании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное повреждение глаз. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии или астмы или затруднение дыхания. Может вызвать раздражение дыхательных путей. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / брызг. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица. Носить респираторную защиту. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снять контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжать промывать. В случае воздействия или беспокойности: немедленно позвонить врачу. Вывести пострадавшего на свежий воздух и держать в покое в удобном для дыхания положении.

Условия транспортировки и хранения реагентов

Колонки QIAamp Mini должны храниться при температуре 2–8°C по прибытии и могут использоваться до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Все буферы могут храниться при комнатной температуре (15–25°C) до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Лиюфилизированный РНК-носитель может храниться при комнатной температуре (15–25°C) до истечения срока годности, указанного на упаковке набора. РНК-носитель может быть растворен только в буфере AVE; растворенный РНК-носитель следует немедленно добавить в буфер AL. Этот раствор должен быть приготовлен в свежем виде и стабилен при 2–8°C в течение до 48 часов. Неиспользованные части РНК-носителя, растворенные в буфере AVE, следует заморозить в аликвотах при температуре от –30°C до –15°C.

Лиюфилизированную протеазу QIAGEN (QP) можно хранить при комнатной температуре (15–25°C) до истечения срока годности набора, не влияя на производительность. Восстановленная протеаза QIAGEN стабильна до 1 года при хранении при 2–8°C, но только до истечения срока годности набора.

Восстановленный промывочный буфер 1 (AW1) и восстановленный промывочный буфер 2 (AW2) стабильны до 1 года при хранении при комнатной температуре (15–25°C), но только до истечения срока годности набора.

Условия транспортировки и хранения образцов

После сбора и центрифугирования плазму или сыворотку можно хранить при температуре 2–8°C до 6 часов. Для длительного хранения рекомендуется замораживание при –20°C или –80°C в аликвотах. Замороженные образцы плазмы или сыворотки нельзя размораживать более одного раза. Повторное замораживание-оттаивание приводит к денатурации и осаждению белков, что приводит к снижению титров вируса и, следовательно, снижению выхода вирусных нуклеиновых кислот. Кроме того, криопреципитаты, образующиеся во время замораживания-оттаивания, закупоривают мембрану QIAamp MinElute. Если криопреципитаты видны, их можно гранулировать центрифугированием при приблизительно 6800 × g в течение 3 минут. Очищенный супернатант должен быть удален и обработан немедленно, не нарушая осадок.

Процедура

Перед началом работы:

- После получения набора проверьте все компоненты на наличие повреждений. Не используйте поврежденные компоненты набора, так как это может привести к снижению производительности набора.
- Всегда используйте оборудование без РНКаз.
- Всегда меняйте наконечники. Чтобы свести к минимуму перекрестное загрязнение, мы рекомендуем использовать наконечники с фильтрами.
- Все этапы центрифугирования проводятся при комнатной температуре (15–25°C).
- Всегда используйте одноразовые перчатки.
- Чтобы минимизировать перекрестное загрязнение, открывайте только одну пробирку за раз.
- Не используйте компоненты набора из других наборов с наборами, которые вы используете в настоящее время, если номера партий не совпадают.
- Избегайте микробного загрязнения реагентов набора.
- Для обеспечения безопасности от потенциально инфекционных материалов мы рекомендуем работать в условиях ламинарного воздушного потока, пока образцы не лизируются.
- Этот набор должен использоваться только персоналом, обученным лабораторной практике диагностики *in vitro*.

Колонки QIAamp MinElute

Из-за чувствительности технологий амплификации нуклеиновых кислот необходимо соблюдать следующие меры предосторожности при работе с колонками QIAamp MinElute, чтобы избежать перекрестного загрязнения между препаратами образцов:

- Осторожно нанесите образец или раствор на колонку QIAamp MinElute.
- Меняйте наконечники между всеми переносами жидкости. Рекомендуется использовать наконечники с фильтрами.
- Не прикасайтесь к мембране QIAamp MinElute наконечником.

- После всех этапов вортекса кратковременно центрифугируйте пробирки, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.
- Надевайте перчатки на протяжении всей процедуры. В случае контакта перчаток с образцом, немедленно замените перчатки.

Центрифугирование

- Промывочные и элюирующие пробирки для всех этапов центрифугирования поставляются в наборе.
- Центрифугирование колонок QIAamp MinElute выполняется при приблизительно 6000xg. Центрифугирование колонок QIAamp MinElute на полной скорости не повлияет на выход ДНК или РНК.
- Для просушки мембраны центрифугирование следует проводить на полной скорости.
- Все этапы центрифугирования должны проводиться при комнатной температуре.(15-25°C).

Обработка колонок QIAamp MinElute в микроцентрифуге

- Закройте колонку QIAamp MinElute перед помещением ее в микроцентрифугу и отцентрифугируйте.
- Достаньте колонку QIAamp MinElute и промывную пробирку из центрифуги.
- Поместите колонку QIAamp MinElute в новую промывочную пробирку. Удалите фильтрат. Обратите внимание, что фильтрат может содержать опасные отходы и должен быть утилизирован надлежащим образом.
- Открывайте только одну колонку QIAamp MinElute за раз и старайтесь избегать образования аэрозолей.

Для эффективной параллельной обработки нескольких образцов мы рекомендуем заполнить штатив промывочными пробирками, чтобы колонки QIAamp MinElute можно было переносить после центрифугирования. Использованные промывные пробирки, содержащие фильтрат, можно выбросить, а новые промывочные пробирки, содержащие колонки QIAamp MinElute, можно поместить непосредственно в микроцентрифугу.

Подготовка реагентов и буферов

■ Подготовка РНК

При подготовке вирусной РНК быстро выполняйте ручные шаги процедуры.

■ Приготовление протеазы QIAGEN

Добавьте все содержимое флакона, содержащего 4,4 мл протеазного растворителя (PS), во флакон с лиофилизированной протеазой QIAGEN (QP) и тщательно перемешайте. Чтобы избежать пенообразования, смешайте, перевернув флакон несколько раз. Убедитесь, что протеаза QIAGEN (QP) полностью растворена.

Не добавляйте QIAGEN протеазу (QP) непосредственно в буфер AL.

Протеаза QIAGEN (QP), восстановленная в протеазном растворителе (PS), стабильна в течение одного года при хранении при 2–8°C, но только до истечения срока годности набора. Следует избегать хранения исходного раствора протеазы QIAGEN при комнатной температуре в течение длительных периодов времени.

■ Добавление РНК-носителя в буфер AL

Добавьте 310 мкл буфера AVE в пробирку, содержащую 310 мкг лиофилизированного РНК-носителя, чтобы получить раствор 1 мкг / мкл. Тщательно растворите РНК-носитель, разделите на аликвоты удобного размера и храните при температуре от –25 до –15°C. Не размораживайте аликвоты РНК-носителя более 3 раз. РНК-носитель не растворяется в буфере AL. Сначала его нужно растворить в буфере AVE, а затем добавить в буфер AL.

Рассчитайте объем смеси буфера AL и РНК-носителя, необходимой для каждой партии образцов, выбрав количество образцов, подлежащих одновременной обработке, из Таблицы 1. Для большего количества образцов объемы можно рассчитать, используя расчет образцов ниже:

$$n \times 0,22 \text{ мл} = y \text{ мл}$$

$$y \text{ мл} \times 28 \text{ мкл / мл} = z \text{ мкл}$$

где: **n** = количество выборок для одновременной обработки

y = рассчитанный объем буфера AL

z = объем несущей РНК-буфера AVE для добавления в буфер AL

Аккуратно перемешайте, перевернув пробирку 10 раз. Чтобы избежать пенообразования, не встряхивайте.

Таблица 1. Объемы (об.) для определенного количества (№) образцов для процедуры QIAamp DSP Virus Spin

Кол-во образцов	Объем AL	Объем AVE	Кол-во образцов	Объем AL	Объем AVE
1	0.22 ml	6.2 μ l	13	2.86 ml	80.1 μ l
2	0.44 ml	12.3 μ l	14	3.08 ml	86.3 μ l
3	0.66 ml	18.5 μ l	14	3.30 ml	92.4 μ l
4	0.88 ml	24.6 μ l	16	3.52 ml	98.6 μ l
5	1.10 ml	30.8 μ l	17	3.74 ml	104.7 μ l
6	1.32 ml	37.0 μ l	18	3.96 ml	110.9 μ l
7	1.54 ml	43.1 μ l	19	4.18 ml	117.0 μ l
8	1.76 ml	49.3 μ l	20	4.40 ml	123.2 μ l
9	1.98 ml	55.4 μ l	21	4.62 ml	129.4 μ l
10	2.20 ml	61.6 μ l	22	4.84 ml	135.5 μ l
11	2.42 ml	67.8 μ l	23	5.06 ml	141.7 μ l
12	2.64 ml	73.9 μ l	24	5.28 ml	147.8 μ l

Процедура подготовки образца оптимизирована для 5,6 мкг РНК-носителя на образец. Если было показано, что меньшее количество РНК-носителя лучше для вашего амплификатора, перенесите только необходимое количество растворенного РНК-носителя в пробирки, содержащие буфер AL. Для каждого микрограмма РНК-носителя, необходимого для каждого препарата, добавьте 5 мкл РНК-носителя, растворенного в буфере AVE, на миллилитр буфера AL. Использование менее 5,6 мкг РНК-носителя на образец должно быть подтверждено для каждого конкретного типа образца и последующего анализа.

Буфер AW1

Добавьте 25 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 19 мл концентрата буфера AW1, как описано на флаконе. Установите флажок на этикетке, чтобы указать, что этанол был добавлен. Храните восстановленный буфер AW1 при комнатной температуре (15–25°C). Восстановленный буфер AW1 стабилен в течение одного года при хранении при комнатной температуре, но только до истечения срока годности набора. Всегда смешивайте восстановленный буфер AW1, встряхивая перед началом процедуры.

Буфер AW2

Добавьте 30 мл этанола (96–100%) во флакон, содержащий 13 мл концентрата буфера AW2, как описано на флаконе. Установите флажок на этикетке, чтобы указать, что этанол был добавлен. Храните восстановленный буфер AW2 при комнатной температуре (15–25°C). Восстановленный буфер AW2 стабилен в течение одного года при хранении при комнатной температуре, но только до истечения срока годности набора. Всегда смешивайте восстановленный буфер AW2, встряхивая перед началом процедуры.

Элюция нуклеиновых кислот

Элюирующий буфер должен быть доведен до комнатной температуры, прежде чем он будет нанесен на колонку.

Протокол: Очистка вирусных нуклеиновых кислот из плазмы или сыворотки.

Этот протокол предназначен для очистки вирусных нуклеиновых кислот из 200 мкл плазмы или сыворотки с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin и микроцентрифуги. Для автоматической очистки с использованием QIAamp DSP Virus Spin Kit с QIAcube, обратитесь к Руководству пользователя QIAcube и соответствующему листу протокола.

Важно

- Все этапы центрифугирования проводятся при комнатной температуре (15–25°C).

Перед началом работы

- Доведите образцы до комнатной температуры (15–25°C).
- Доведите буфер AVE до комнатной температуры для элюирования на этапе 14.
- Установите нагревательный блок на 56°C ± 3°C для шага 4.
- Убедитесь, что Буфер AW1, Буфер AW2 и Протеаза QIAGEN (QP) были приготовлены в соответствии с инструкциями.
- Добавьте РНК-носитель, восстановленный в буфере AVE, в буфер AL в соответствии с инструкциями.

Процедура

1. Внесите 25 мкл протеазы QIAGEN (QP) в лизисную пробирку (LT).
Прочтите «Подготовка реагентов и буферов» для получения информации о ресуспендировании протеазы QIAGEN (QP) в протеазном растворителе (PS).
2. Добавьте 200 мкл плазмы или сыворотки в лизисную пробирку (LT).
Если объем образца составляет менее 200 мкл, добавьте соответствующий объем 0,9% раствора хлорида натрия, чтобы довести объем протеазы и пробы до общего объема 225 мкл.
3. Добавьте 200 мкл буфера AL (содержащего 28 мкг / мл РНК-носителя).
Закройте крышку и перемешайте на вортексе в течение ≥15 секунд.

Для обеспечения эффективного лизиса важно, чтобы образец и буфер AL тщательно перемешивались для получения гомогенного раствора.

Не добавляйте QIAGEN протеазу (QP) непосредственно в буфер AL.

4. Инкубируйте при $56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут $\pm$ 1 минута в нагревательном блоке.
5. Осадите капли.
6. Добавьте 250 мкл этанола (96–100%) к образцу, закройте крышку и тщательно перемешайте на вортексе в течение ≥ 15 секунд. Инкубируйте лизат с этанолом в течение 5 минут $\pm$ 30 секунд при комнатной температуре ($15\text{--}25^{\circ}\text{C}$).

Если температура окружающей среды превышает 25°C , этанол следует охлаждать на льду перед добавлением в лизат.

7. Осадите капли.
8. Осторожно нанесите весь лизат из этапа 7 на колонку QIAamp MinElute. Закройте крышку и центрифугируйте примерно при $6000 \times g$ в течение >1 минуты. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую пробирку для промывки объемом 2 мл (WT) и выбросьте пробирку для промывки, содержащую фильтрат.

Если после центрифугирования лизат не прошел полностью через колонку, снова центрифугируйте на более высокой скорости, пока колонка QIAamp MinElute не опустеет.

9. Осторожно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл буфера AW1. Закройте крышку и центрифугируйте примерно при $6000 \times g$ в течение ≥ 1 минуты. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую пробирку для промывки объемом 2 мл (WT) и выбросьте пробирку для промывки, содержащую фильтрат.
10. Осторожно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл буфера AW2. Закройте крышку и центрифугируйте при $6000 \times g$ в течение ≥ 1 минуты. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую промывочную пробирку объемом 2 мл и выбросьте промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

11. Осторожно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл этанола (96–100%). Закройте крышку и центрифугируйте примерно при 6000 x g в течение > 1 минуты. Удалите фильтрат.
Не допускайте перенос этанола.
12. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую пробирку для промывки объемом 2 мл (WT). Центрифугируйте на полной скорости (примерно 20000 x g) в течение 3 минут ± 30 секунд, чтобы полностью высушить мембрану.
13. Поместите колонку QIAamp MinElute в новую промывочную пробирку объемом 2 мл (WT), откройте крышку и инкубируйте сборку при 56°C ± 3°C в течение 3 минут ± 30 секунд, чтобы полностью высушить мембрану. Этот шаг служит для испарения любой оставшейся жидкости.
14. Поместите колонку QIAamp MinElute в элюирующую пробирку (ET) и выбросьте промывочную пробирку с фильтратом. Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp MinElute и нанесите 20–150 мкл буфера AVE на центр мембраны. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут. Центрифугируйте на полной скорости (около 20000 x g) в течение > 1 минуты.
Убедитесь, что буфер для элюции доведен до комнатной температуры. Если элюция проводится в небольших объемах (<50 мкл), буфер для элюции должен быть распределен по центру мембраны для полного элюирования связанной РНК и ДНК.
Объем элюции является гибким и может быть адаптирован в соответствии с требованиями последующего применения. Помните, что объем извлеченного элюата будет примерно на 5 мкл меньше объема буфера для элюции, нанесенного на колонку.

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия комплекта QIAamp DSP Virus Spin Kit проверяется на соответствие заранее заданным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

Производительность наборов была установлена с использованием образцов плазмы и сыворотки для выделения вирусных нуклеиновых кислот.

Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности набора для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями производительности QIAGEN.

Чтобы свести к минимуму риск негативного влияния на результаты диагностики, следует использовать соответствующие средства контроля для последующих приложений. Для дальнейшей проверки рекомендуются руководящие принципы Международной конференции по гармонизации технических требований (ICH) в ICH Q2 (R1) Валидация аналитических процедур: текст и методология. Любые результаты диагностики должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими или лабораторными данными.

Заявленные характеристики

Смотри www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance.

Источники

QIAGEN поддерживает обширную, актуальную онлайн-базу научных публикаций, использующих продукты QIAGEN. Широкие возможности поиска позволяют вам найти нужные статьи, либо с помощью простого поиска по ключевым словам, либо указав приложение, область исследования, название и т. Д.

Для получения полного списка ссылок посетите справочную базу данных QIAGEN в Интернете по адресу www.qiagen.com/RefDB/search.asp или обратитесь в службу технической поддержки QIAGEN или к местному дистрибьютору.

Символы



Количество реагентов достаточно для 50 выделений

См. руководство пользователя

Использовать до

Для диагностики in vitro

Каталожный номер

Номер лота

Материал

Компоненты

Объем

Температурные границы

По прибытии

Производитель

Важные заметки

Заменить перчатки

Открыть при доставке

Торговый номер

Написать текущую дату после добавления этанола

Добавить

Содержит

Лиофилизированный

Восстановить в

Этанол

GuHCl	Гуанидин гидрохлорид
MALEIC ACID	Малеиновая кислота
SUBT	Субтилизин
➡	Приводит к

Контактная информация

В QIAGEN мы гордимся качеством и доступностью нашей технической поддержки. Наши отделы технического обслуживания укомплектованы опытными учеными, обладающими обширными практическими и теоретическими знаниями в области технологий отбора проб и анализа и использования продуктов QIAGEN. Если у вас есть какие-либо вопросы или какие-либо трудности, связанные с QIAamp DSP Virus Spin Kit или продуктами QIAGEN в целом, пожалуйста, не стесняйтесь обращаться к нам. Клиенты QIAGEN являются основным источником информации о продвинутом или специализированном использовании наших продуктов. Эта информация полезна для других ученых, а также для исследователей QIAGEN. Поэтому мы рекомендуем вам связаться с нами, если у вас есть какие-либо предложения по поводу производительности продукта или новых приложений и методов.

Для получения технической помощи и получения дополнительной информации посетите наш Центр технической поддержки по адресу www.qiagen.com/Support или позвоните в один из отделов технического обслуживания QIAGEN или к местным дистрибьюторам.

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724, Хильден, Германия

Приложение

Обращение с РНК

Рибонуклеазы (РНКазы) являются очень стабильными и активными ферментами, которые обычно не требуют кофакторов для функционирования. Поскольку РНКазы трудно инактивировать, и для уничтожения РНК достаточно лишь незначительных количеств, не используйте никакую пластиковую или стеклянную посуду без предварительного устранения возможного загрязнения РНКазой. Следует позаботиться о том, чтобы избежать случайного введения РНКаза в образец РНК во время или после процедуры выделения. Для создания и поддержания среды, свободной от РНКазы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности при предварительной обработке и использовании одноразовых и одноразовых сосудов и растворов при работе с РНК.

Общая обработка

Надлежащая микробиологическая асептическая техника всегда должна использоваться при работе с РНК. Руки и частицы пыли могут нести бактерии и плесень и являются наиболее распространенными источниками загрязнения РНКазой. Всегда надевайте латексные или виниловые перчатки при работе с реагентами и образцами РНК, чтобы предотвратить загрязнение РНКазой с поверхности кожи или от пыльного лабораторного оборудования. Часто меняйте перчатки и держите пробирки закрытыми.

Одноразовая пластиковая посуда

Неиспользуемые пластиковые изделия должны быть обработаны перед использованием, чтобы убедиться, что они не содержат РНКазы. Пластиковую посуду следует тщательно промыть 0,1 М NaOH, * 1 мМ ЭДТА *, а затем водой без РНКазы. В качестве альтернативы, устойчивую к хлороформу пластиковую посуду можно промыть хлороформом для инактивации РНКаза.

Изделия из стекла

Стеклянная посуда должна быть обработана перед использованием, чтобы убедиться, что она не содержит РНКазы. Стеклянная посуда, используемая для работы с РНК, должна быть очищена моющим средством, тщательно ополоснута и

прожарена при температуре > 240°C в течение четырех или более часов (в течение ночи, если это более удобно) перед использованием. Автоклавирование само по себе не полностью инактивирует многие РНКазы. Прожарка в духовке инактивирует рибонуклеазы и гарантирует, что никакие другие нуклеиновые кислоты (такие как плазмидная ДНК) не останутся на поверхности стеклянной посуды. В качестве альтернативы стеклянную посуду можно обработать DEPC (диэтилпирокарбонатом). Накройте стеклянную посуду 0,1% DEPC в воде в течение ночи (12 часов) при 37°C, а затем в автоклаве или нагревают до 100°C в течение 15 минут для удаления остаточного DEPC.

Пробирки Correx® должны быть очищены от РНКазы обработкой DEPC, а не прожаркой.

Ванночки для электрофореза

Ванночки для электрофореза должны быть очищены раствором моющего средства (например, 0,5% SDS), промыты водой, высушены с помощью этанола, и затем заполнены раствором 3%-ной перекиси водорода. Через 10 минут при комнатной температуре ванночки для электрофореза следует тщательно промыть водой без РНКазы.

Растворы

Растворы (вода и другие растворы) следует обрабатывать 0,1% DEPC. DEPC будет реагировать с первичными аминами и не может использоваться непосредственно для обработки трис-буферов. DEPC очень нестабилен в присутствии трис-буферов и быстро разлагается на этанол и CO₂. При подготовке трис-буферов сначала обработайте воду DEPC, а затем растворите трис, чтобы получить соответствующий буфер. DEPC является сильным, но не абсолютным ингибитором РНКаз. Обычно его используют в концентрации 0,1% для инактивации РНКаз на стекле или пластике или для создания растворов без РНКазы и воды. Следовые количества DEPC модифицируют пуриновые остатки в РНК путем карбоэтоксилирования. Карбоэтоксилированная РНК транскрибируется с очень низкой эффективностью в бесклеточных системах. Тем не менее, его способность образовывать гибриды ДНК: РНК или РНК: РНК не подвергается серьезному влиянию, если большая часть пуриновых остатков не была модифицирована.

Остаточный DEPC всегда следует удалять из растворов или сосудов путем автоклавирования или нагревания до $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут $\pm$ 1 минуты. Добавьте 0,1 мл DEPC к 100 мл обрабатываемого раствора и энергично встряхните, чтобы ввести DEPC в раствор, или дайте раствору инкубироваться в течение > 12 часов при $37 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Автоклав в течение 15 минут $\pm$ 1 минуты, чтобы удалить любые следы DEPC. Может быть желательно проверить источники воды на наличие

загрязняющие РНКазы, поскольку многие источники дистиллированной воды свободны от активности РНКазы.

Буферы QIAamp DSP Virus Spin Kit не освобождаются от РНКазы при обработке DEPC и, следовательно, не содержат DEPC.

Заказ www.qiagen.com/shop

Техническая поддержка support.qiagen.com

Веб-сайт www.qiagen.com

Руководство по использованию набора RNeasy® DSP FFPE Kit

Версия 1

Для диагностики *in vitro*



73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germany



1106945EN

- Sample to Insight



Содержание

Назначение	3
Пояснения	3
Принципы процедуры	4
Предоставляемые материалы	6
Состав набора	6
Необходимые материалы, предоставляемые пользователем	7
Меры предосторожности	8
Условия транспортировки и хранения реагентов	11
Компоненты набора	11
Важные заметки	12
Подготовка буферов	13
Процедура	14
Протокол: Протокол: Очистка общей РНК из срезов ткани FFPE.	15
Контроль качества	18
Ограничения	18
Символы	19
Руководство по устранению неполадок	21
Приложение: Общие замечания по обращению с РНК	24
Информация для заказа	27

Назначение

RNeasy DSP FFPE Kit - это система, предназначенная для очистки тотальной РНК из тканей с фиксированным парафином (FFPE), фиксированных формалином.

Продукт предназначен для использования врачами и научными сотрудниками, которые обучены молекулярно-биологическим методам.

Он использует оптимизированный протокол на основе спин-колонок с диоксидом кремния и включает ферментативное удаление остаточной ДНК.

Набор RNeasy DSP FFPE предназначен для диагностики *in vitro*.

Пояснения

Набор RNeasy DSP FFPE специально разработан для очистки тотальной РНК из срезов тканей с фиксированным парафином (FFPE). Выделив молекулы РНК длиной более 70 нуклеотидов, набор обеспечивает восстановление пригодных для использования фрагментов РНК для таких применений, как ОТ-ПЦР.

Из-за условий фиксации и встраивания нуклеиновые кислоты в образцах FFPE обычно фрагментированы и химически модифицированы формальдегидом. Поэтому нуклеиновые кислоты, выделенные из образцов FFPE, часто имеют более низкую молекулярную массу, чем те, которые получены из свежих или замороженных образцов. Степень фрагментации зависит от типа и возраста образца, а также от условий фиксации, встраивания и хранения образца. Для стандартизации процессов предварительной экспертизы тканей FFPE мы рекомендуем действовать в соответствии со стандартом CEN CEN / TS 16827-1_2015.

Хотя модификация формальдегида не может быть обнаружена в стандартных анализах контроля качества, таких как гель-электрофорез или лабораторный анализ, она сильно мешает ферментативному анализу.

В то время как набор RNeasy DSP FFPE оптимизирован таким образом, чтобы полностью изменить модификацию формальдегида, насколько это возможно, без дальнейшей деградации РНК, нуклеиновые кислоты, очищенные из образцов FFPE, не должны использоваться в последующих приложениях, требующих полноразмерной РНК. В некоторых приложениях могут потребоваться модификации, позволяющие использовать фрагментированную РНК (например, создание

небольших ампликонов для ОТ-ПЦР). Для синтеза кДНК следует использовать случайные или геноспецифичные праймеры вместо олиго-dT праймеров.

Окрашивание срезов FFPE может также ухудшить качество и производительность РНК в последующих приложениях. Это особенно верно для многих иммуногистохимических протоколов окрашивания.

Принципы процедуры

Процедура RNeasy DSP FFPE использует хорошо зарекомендовавшую себя технологию RNeasy для очистки РНК. Специально оптимизированные условия лизиса позволяют эффективно очищать общую РНК из срезов тканей FFPE. Стадия расщепления ДНКазой I эффективно удаляет загрязнения ДНК, в том числе сильно фрагментированные молекулы.

Сначала весь парафин удаляют из свежих срезов ткани FFPE путем обработки раствором для депарафинизации. Затем образцы инкубируют в оптимизированном буфере для лизиса, который содержит протеиназу К для высвобождения РНК из срезов. Короткая инкубация при более высокой температуре частично устраняет сшивание формалином высвобождаемых нуклеиновых кислот, улучшая выход и качество РНК, а также производительность РНК в последующих ферментных анализах. Затем следует обработка ДНКазой I, которая оптимизирована для удаления геномной ДНК, включая очень маленькие фрагменты ДНК, которые часто присутствуют в образцах FFPE после длительной фиксации формалином и / или длительного хранения. Далее лизат смешивают с буфером RBC. Этанол добавляется для обеспечения соответствующих условий связывания РНК, а затем образец наносится на спин-колонку RNeasy MinElute, где общая РНК связывается с мембраной, а загрязняющие вещества эффективно вымываются. РНК затем элюируют минимум в 14 мкл воды, свободной от РНКаз.

Процедура экстракции RNeasy DSP FFPE

Парафинизированные срезы ткани



Рисунок 1 Процедура выделения РНК

Предоставляемые материалы

Состав набора

Набор реагентов RNeasy DSP FFPE Kit		(50)
Каталожный номер		73604
Количество образцов		50
	Состав	Количество
RNeasy MinElute Spin	Спин-колонки, каждая в пробирке для сбора образца	50
ET	Элюирующие пробирки	50
LT	Лизисные пробирки	150
WT	Отмывочные пробирки	250
DPS	Раствор для депарафинизации	20 мл
RBC	Буфер RBC	45 мл
PKD	Буфер PKD	15 мл
PK	Протеиназа К	1,25 мл
DN	ДНКаза-1, лиофилизированная	1
RNFW	Вода без РНКаза	3x1,5 мл
DBB	ДНКазный бустерный буфер	2 мл
RPE	Буфер RPE † (концентрат)	11 мл
HB, v1	Инструкция	1

* Содержит соль гуанидина. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель.

† Перед первым использованием добавьте 4 объема этанола (96–100%, неденатурированный), как указано на флаконе, чтобы получить рабочий раствор.

Необходимые материалы, предоставляемые пользователем

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

Убедитесь, что инструменты были проверены и откалиброваны в соответствии с рекомендациями производителя.

- Стерильные, не содержащие РНКазы наконечники и пипетки
- Микроцентрифуга (с ротором на 2 мл пробирки)
- Вортекс
- 100% этанол (не используйте денатурированный спирт, который содержит другие вещества, такие как метанол или метилэтилкетон)
- Одноразовые перчатки
- Нагревательный блок с функцией встряхивания, способный к инкубации при 56°C и 80°C

Меры предосторожности

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety , где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буферы в наборе RNeasy DSP FFPE kit содержат азид натрия. Если буферы из набора пролиты, очистите их подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия.

Следующие сведения об опасности и мерах предосторожности относятся к компонентам набора RNeasy DSP FFPE kit.

PKD, RPE, RNFW, DBB

Содержит: азид натрия. Предупреждение! Может быть вреден при проглатывании. Позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу, если вы плохо себя чувствуете.

DSP



Содержит: гексадекан. Опасно! Может быть смертельным при проглатывании и попадании в дыхательные пути. Повторное воздействие может вызвать сухость или растрескивание кожи. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Не вызывает рвоту. ЕСЛИ ПРОГЛОТИЛИ: Немедленно вызвать ВРАЧА.

Протеиназа К



Содержит: протеиназу К. Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии или астмы или затруднение дыхания. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / брызг. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При появлении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу / врачу. ПРИ ВДЫХАНИИ: Если дыхание затруднено, выведите пострадавшего на свежий воздух и держите в покое в удобном для дыхания положении. Носите респираторную защиту.

ДНКаза I



Содержит: дезоксирибонуклеазу. Опасно! Может вызвать аллергическую кожную реакцию. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии или астмы или затруднение дыхания. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / пара / спрея. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При появлении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. ПРИ ВДЫХАНИИ: Если дыхание затруднено, выведите пострадавшего на свежий воздух и держите в покое в удобном для дыхания положении. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным

использованием. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица. Носите респираторную защиту.

RBC



Содержит: гидрохлорид гуанидина. Опасно! Вреден при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или врачу, если вы плохо себя чувствуете. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

DBB



Содержит: хлорид кальция; хлористый водород. Опасно! Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и их легко сделать. Продолжайте промывать. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ: промыть большим количеством воды с мылом. При раздражении кожи: обратиться к врачу. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Условия транспортировки и хранения реагентов

RNase-Free DNase I и колонки RNeasy MinElute следует хранить при температуре 2–8°C сразу по прибытии. Буферы можно хранить при комнатной температуре (15–25°C). При этих условиях набор может храниться в соответствии с датой истечения срока годности на этикетке коробки без снижения производительности.

Не используйте RNeasy DSP FFPE Kit после истечения срока его действия.

Компоненты набора

Срок годности каждого реагента указан на ярлыках отдельных компонентов. При правильных условиях хранения продукт будет поддерживать производительность в течение указанного срока годности.

Для длительного хранения ДНКазы I после восстановления извлеките исходный раствор из флакона, разделите его на аликвоты одноразового использования и храните при температуре от –15 до –30°C до 9 месяцев. Оттаявшие аликвоты можно хранить при 2–8°C до 6 недель. Не замораживать аликвоты после оттаивания.

Избегайте воздействия на реагенты ультрафиолетового света (например, используемого для дезактивации), так как воздействие может вызвать ускоренное старение.

Важные заметки

Исходный материал

Стандартные процедуры фиксации формалином и парафином всегда приводят к значительной фрагментации и сшиванию нуклеиновых кислот. Чтобы ограничить степень фрагментации и сшивания нуклеиновых кислот, обязательно:

- Используйте образцы ткани толщиной менее 5 мм, чтобы обеспечить полное проникновение формалина
- Фиксируйте образцы ткани в 4–10% формалине с нейтральным буфером как можно быстрее после хирургического удаления.
- Используйте максимальное время фиксации 24 часа (более длительное время фиксации приводит к чрезмерной фиксации и более серьезной фрагментации нуклеиновой кислоты, что приводит к плохим результатам в последующих анализах)
- Тщательно обезживайте образцы перед фиксацией
- Используйте легкоплавкий парафин для фиксации

Исходным материалом для очистки РНК должны быть свежесрезанные срезы ткани FFPE, каждая толщиной до 20 мкм. Более толстые срезы могут привести к снижению выхода нуклеиновых кислот даже после длительной инкубации с протеиназой К. В одном препарате можно объединить до 4 срезов, каждый толщиной до 10 мкм. Можно объединить более 4 секций, если общая сумма толщины секций составляет 40 мкм или менее (например, восемь секций толщиной 5 мкм).

Для тканей с особенно высоким содержанием ДНК мы рекомендуем использовать меньшее количество срезов на препарат, чтобы избежать загрязнения ДНК очищенной РНК.

Если нет никакой информации о природе вашего исходного материала, мы рекомендуем начинать с не более 2 срезов каждого препарата. В зависимости от выхода и чистоты РНК может быть возможно использовать до 4 срезов в последующих препаратах. Однако перегрузка спиновой колонки RNeasy MinElute может значительно снизить выход и качество РНК.

Подготовка буферов

Приготовление стокового раствора ДНКазы I

Подготовьте исходный раствор ДНКазы I, растворив лиофилизированную ДНКазу I в 550 мкл воды без РНКаз. Чтобы избежать потери ДНКазы I, не открывайте флакон. Впрысните воду без РНКазы во флакон, используя иглу и шприц без РНКазы. Аккуратно перемешайте, перевернув флакон. Не используйте вортекс. В некоторых случаях флакон ДНКазы I может показаться пустым. Это связано с прилипанием лиофилизированного фермента к перегородке. Чтобы избежать потери ДНКазы I, не открывайте флакон. Вместо этого растворите ДНКазу I, используя иглу и шприц.

Примечание: ДНКазы I особенно чувствительна к физической денатурации. Смешивание должно осуществляться только путем осторожного переворачивания флакона.

Примечание: пожалуйста, позаботьтесь о том, чтобы весь объем воды, не содержащей РНКазы, впрыскивался во флакон.

Нерастворимый материал может остаться после растворения ДНКазы I. Из-за производственного процесса нерастворимый материал может присутствовать в лиофилизированной ДНКазе I. Это не влияет на работу ДНКазы I.

Для длительного хранения ДНКазы I выньте исходный раствор из флакона, разделите его на одноразовые аликвоты и храните при температуре от -15 до -30°C до 9 месяцев. Оттаявшие аликвоты можно хранить при $2-8^{\circ}\text{C}$ до 6 недель. Не замораживать аликвоты после оттаивания.

Приготовление буфера RPE

Добавьте 4 объема (44 мл) этанола (96–100%) во флакон, содержащий 11 мл концентрата буфера RPE. Установите флажок на этикетке бутылки, чтобы указать, что этанол был добавлен.

Примечание: перед началом процедуры смешайте восстановленный буфер RPE, встряхивая.

Процедура

Важные моменты перед началом работы

- При первом использовании набора RNeasy DSP FFPE прочтите «Важные заметки».
- Если вы впервые работаете с РНК, прочтите «Приложение. Общие замечания по работе с РНК».
- Буфер RBC содержит соль гуанидина и поэтому не совместим с дезинфицирующими реагентами, содержащими отбеливатель.
- Если не указано иное, выполните все этапы процедуры при комнатной температуре (15–25°C). Во время процедуры работайте быстро; не останавливайтесь между этапами.
- Выполните все этапы центрифугирования с помощью микроцентрифуги, помещенной при 15–25°C. При использовании охлаждаемой микроцентрифуги установите температуру на уровне 20–25°C, в противном случае может произойти значительное охлаждение ниже 15°C.
- В приведенной ниже процедуре ▲ указывает объемы, которые следует использовать при обработке 1–2 срезов на образец, а ● указывает объемы, которые следует использовать при обработке > 3–4 срезов на образец.
- Если вы впервые используете буфер RPE и RNase-Free DNase I, восстановите их, как описано в разделе «Подготовка буферов».
- Доведите все буферы до комнатной температуры (15–25°C). Смешайте восстановленный буфер RPE.
- Установите термомешалку на 56°C для использования на шаге 5 и шаге 9. Чтобы сократить время ожидания, установите вторую термомешалку на 80°C для использования на шаге 9.
- **Примечание:** не останавливайте процедуру очистки между периодами, так как увеличение времени инкубации может привести к потере или деградации РНК. Среднее время обработки до 12 образцов параллельно составляет около 130 минут.

Протокол: Протокол: Очистка общей РНК из срезов ткани FFPE.

1. С помощью скальпеля удалите излишки парафина с блока пробы.
2. Вырежьте срезы толщиной 5–20 мкм. Если поверхность образца подверглась воздействию воздуха, откажитесь от первых 2–3 секций.
3. Немедленно поместите срезы в микроцентрифужную пробирку объемом ▲ 1,5 или ● 2 мл и закройте крышку.
4. Добавьте ▲ 160 мкл или ● 320 мкл раствора для депарафинизации, энергично встряхивайте в течение 10 секунд и осадите капли.
5. Инкубируйте при 56°C в течение 3 минут, затем остудите в течение 5 минут при комнатной температуре. Если используется слишком мало раствора для депарафинизации или если с образцом уносится слишком много парафина, раствор для депарафинизации может стать восковым или твердым после охлаждения. Если это происходит, добавьте дополнительный раствор депарафинирования с шагом 160 мкл и повторите шаг 5.
6. Добавьте ▲ 150 мкл или ● 240 мкл буфера PKD и перемешайте встряхиванием в течение 3 секунд.
7. Центрифугируйте в течение 1 минуты при 11000 x g.
8. Добавьте 10 мкл протеиназы K в нижнюю прозрачную фазу и осторожно перемешайте пипеткой 10 раз вверх и вниз (не смешивайте разделенные фазы).
9. Инкубируйте при 56°C в течение 15 минут при 1100 об / мин, затем при 80°C в течение 15 минут при 1100 об / мин. Если используется только один нагревательный блок, оставьте образец при комнатной температуре после инкубации 56°C, пока нагревательный блок не достигнет 80°C.

Примечание: полное расщепление ткани протеиназой K не требуется для максимального выхода РНК; однако, этап инкубации при 80°C имеет решающее значение.

ВАЖНО: Перед началом 15-минутной инкубации убедитесь, что нагревательный блок достиг 80°C. Инкубация в течение 15 минут при 80°C имеет решающее значение для удаления сшивок формальдегида.

10. Кратко отцентрифугируйте и перенесите ▲ 145 мкл или ● 230 мкл нижней неокрашенной фазы в новую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.
11. Инкубировать на льду в течение 3 минут. Затем центрифугируйте в течение 15 минут при 20000 x g.
12. Перенесите супернатант в новую микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл, стараясь не повредить осадок. Осадок содержит нерастворимые остатки ткани, включая сшитую ДНК.
13. Добавьте буфер DNase Booster, эквивалентный одной десятой от общего объема образца (.▲ 14,5 мкл или ● 23 мкл) и 10 мкл исходного раствора ДНКаза I. Смешайте, переворачивая пробирку. Осадите капли.
Примечание: ДНКаза I поставляется лиофилизированной и должна быть восстановлена.
Примечание: ДНКаза I особенно чувствительна к денатурации. Смешивание должно выполняться только путем осторожного переворачивания пробирки. Не использовать вортекс.
14. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 15 минут.
15. Добавьте ▲ 320 мкл или ● 500 мкл буфера RBC для корректировки условий связывания и тщательно перемешайте лизат путем встряхивания в течение 3 секунд и короткого центрифугирования.
16. Добавьте ▲ 720 мкл или ● 1200 мкл этанола (100%) к образцу. Не центрифугируйте. Перейдите сразу к шагу 17. Осадки могут быть видны после добавления этанола. Это не влияет на процедуру.
17. Хорошо перемешайте, пипеткой 5 раз вверх и вниз и перенесите 700 мкл образца, включая любой осадок, который мог образоваться, в спин-колонку RNeasy MinElute, помещенную в пробирку для сбора 2 мл. Аккуратно закройте крышку и центрифугируйте в течение 15 секунд при $\geq 8000 \times g$. Поместите колонку в новую пробирку для сбора (прилагается).
18. Повторяйте шаг 17 (без дополнительного перемешивания), пока весь образец не пройдет через спин-колонку RNeasy MinElute.

19. Добавьте 500 мкл буфера RPE в спин-колонку RNeasy MinElute. Аккуратно закройте крышку и центрифугируйте в течение 15 секунд при $\geq 8000 \times g$. Поместите колонку в новую пробирку для сбора (прилагается).

Примечание: буфер RPE поставляется в виде концентрата. Убедитесь, что этанол добавлен перед использованием.

20. Добавьте 500 мкл буфера RPE в спин-колонку RNeasy MinElute. Аккуратно закройте крышку и центрифугируйте в течение 2 минут при $\geq 8000 \times g$, чтобы промыть мембрану центрифуги. Поместите колонку в новую пробирку для сбора (прилагается).

21. Центрифугируйте на полной скорости в течение 5 минут. Чтобы избежать повреждения крышек, поместите пробирки в центрифугу как минимум с одной пустой позицией между колонками. Сориентируйте крышки так, чтобы они указывали в направлении, противоположном вращению ротора (например, если ротор вращается по часовой стрелке, поверните крышки против часовой стрелки).

Важно высушить мембрану, поскольку остаточный этанол может мешать последующим реакциям. Центрифугирование с открытыми крышками гарантирует, что этанол не переносится во время элюирования РНК.

22. Поместите спин-колонку RNeasy MinElute в новую пробирку для сбора 1,5 мл (прилагается). Добавьте 14–32 мкл РНКазы без воды непосредственно в центр мембраны спин колонки. Аккуратно закройте крышку и центрифугируйте в течение 1 минуты на полной скорости, чтобы элюировать РНК. Элюирование меньшими объемами воды без РНКазы приводит к более высоким концентрациям общей РНК, но к более низким выходам РНК.

Примечание. Средний мертвый объем спиновой колонки RNeasy MinElute составляет 2 мкл: при элюировании 14 мкл воды, не содержащей РНКазы, получается приблизительно 12 мкл элюата.

23. Храните РНК при температуре от -60 до -90°C или при температуре от -15 до -30°C до 8 недель.

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия комплекта RNeasy DSP FFPE Kit проверяется на соответствие заранее заданным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

Эффективность набора была установлена в исследованиях оценки эффективности очистки РНК человека из фиксированных формалином, залитых парафином образцов.

Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности набора для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями производительности QIAGEN.

Чтобы свести к минимуму риск негативного влияния на результаты диагностики, следует использовать соответствующие средства контроля для последующих приложений.

Любые результаты должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими или лабораторными данными.

Символы



Количество реагентов достаточно для 50 выделений

См. руководство пользователя

Использовать до

Для диагностики in vitro

Каталожный номер

Номер лота

Материал

Компоненты

Объем

Температурные границы

По прибытии

Производитель

Важные заметки

Заменить перчатки

Открыть при доставке

Торговый номер

Написать текущую дату после добавления этанола

Добавить

Содержит

Лиофилизированный

Восстановить в

Этанол

GuHCl

MALEIC ACID

SUBT



Гуанидин гидрохлорид

Малеиновая кислота

Субтилизин

Приводит к

Руководство по устранению неполадок

Это руководство по устранению неполадок может помочь в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Для получения дополнительной информации см. также страницу часто задаваемых вопросов в нашем Центре технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Ученые Технической службы QIAGEN всегда рады ответить на любые ваши вопросы, касающиеся информации или протоколов, приведенных в данном руководстве, или технологий проб и анализа (www.qiagen.com).

	Комментарии и предложения
Забитая колонка	
А) Слишком много исходного материала	Уменьшите количество исходного материала. Важно использовать правильное количество исходного материала.
Б) Низкая температура центрифугирования	Температура центрифугирования должна составлять 15–25°C. Некоторые центрифуги могут охлаждаться до температуры ниже 15°C даже при установке на 20°C. Это может привести к образованию осадков, которые могут засорить спин-колонну RNeasy MinElute. Если это произойдет, установите температуру центрифугирования на 25°C.
Низкий выход РНК	
А) Низкое качество исходного материала	Образцы, которые были зафиксированы в течение более 24 часов или хранились в течение очень длительных периодов, могут содержать очень мало полезной РНК. Секции, которые были установлены на предметных стеклах микроскопа, могут давать очень мало полезной РНК из-за длительного воздействия воздуха.
Б) Слишком много исходного материала	Перегрузка мембраны снижает выход РНК.
В) РНК все еще связана с мембраной	Повторите элюирование РНК, но инкубируйте спин-колонку на столе в течение 10 минут с RNFW перед центрифугированием.
Г) Неправильное хранение буферов и реагентов	Колонки, а также ДНКазу I необходимо хранить при температуре 2–8°C. Проверьте правильную температуру хранения.

Комментарии и предложения	
Низкое значение A260/A280	
А) Для разведения нуклеиновых кислот использовалась вода	Используйте 10 мМ Трис Cl, pH 7,5, а не воду, чтобы разбавить образец перед измерением чистоты.
Контаминация ДНК	
А) Слишком много исходного материала	Для некоторых типов тканей эффективность удаления ДНК может быть снижена при обработке очень больших количеств. Если элюированная РНК содержит значительное загрязнение ДНК, попробуйте обработать меньшее количество срезов ткани на препарат.
Б) Ткань богата ДНК	При обработке очень большого количества тканей, богатых ДНК (например, тимуса), ДНК может не полностью перевариваться. Повторите процедуру очистки, используя меньшее количество срезов ткани. Проверьте, правильно ли хранилась ДНКазы I.
В) Обратная транскрипция с неподходящим количеством РНК	Большинство обратных транскриптаз предназначены для использования с приблизительно 1 мкг РНК. При выполнении обратной транскрипции с очень маленькими количествами РНК мы рекомендуем использовать обратную транскриптазу, которая специально разработана для высокочувствительной обратной транскрипции.
Низкое качество элюированной РНК	
А) РНК фрагментирована и модифицирована формалином	Инкубация при 80°C имеет решающее значение для оптимальной работы РНК при обратной транскрипции и других ферментативных реакциях. Убедитесь, что температура инкубации поддерживается на уровне 80°C в течение всего 15-минутного времени инкубации. Хотя инкубация при 80°C удаляет некоторые модификации формальдегида, РНК, очищенная из срезов FFPE, не является оптимальным шаблоном для ферментативных реакций. Мы рекомендуем использовать только случайные праймеры или геноспецифические праймеры для синтеза кДНК. Мы также рекомендуем держать ампликоны как можно короче для ПЦР (<500 нуклеотидов).

	Комментарии и предложения
Б) Перенос этанола	Во время второй промывки с использованием буфера RPE обязательно центрифугируйте при $\geq 8\,000 \times g$ в течение 2 минут при 15–25°C, чтобы высушить мембрану спин-колонки RNeasy MinElute. После центрифугирования осторожно извлеките колонку из пробирки, чтобы колонка не соприкасалась с фильтратом. Затем поместите колонку в новую пробирку для сбора и центрифуги на полной скорости в течение 5 минут.
В) Перенос солей	Убедитесь, что буфер RPE был восстановлен путем добавления правильного объема этанола и что буфер находится при комнатной температуре (15–25°C).
Г) Обратная транскрипция с неподходящим количеством РНК	Большинство обратных транскриптаз предназначены для использования с приблизительно 1 мкг РНК. При выполнении обратной транскрипции с очень маленькими количествами РНК мы рекомендуем использовать обратную транскриптазу, которая специально разработана для высокочувствительной обратной транскрипции.

Приложение: Общие замечания по обращению с РНК

Обращение с РНК

Рибонуклеазы (РНКазаы) являются очень стабильными и активными ферментами, которые обычно не требуют кофакторов для функционирования. Поскольку РНКазаы трудно инактивировать и даже небольших количеств достаточно для разрушения РНК, не используйте никакие пластмассовые или стеклянные изделия без предварительного устранения возможного загрязнения РНКазаой. Следует соблюдать большую осторожность, чтобы избежать случайного введения РНКаза в образец РНК во время или после процедуры очистки. Для создания и поддержания среды, свободной от РНКазаы, необходимо соблюдать следующие меры предосторожности при предварительной обработке и использовании одноразовых и многоразовых сосудов и растворов при работе с РНК.

Общие сведения

Надлежащая микробиологическая, асептическая техника всегда должна использоваться при работе с РНК. Руки и частицы пыли могут нести бактерии и плесень и являются наиболее распространенными источниками загрязнения РНКазаой. Всегда надевайте латексные или виниловые перчатки при работе с реагентами и образцами РНК, чтобы предотвратить загрязнение РНКазаой с поверхности кожи или от пыльного лабораторного оборудования. Часто меняйте перчатки и держите трубки закрытыми, когда это возможно. Держите очищенную РНК на льду, когда пипетки пипеткой для последующих приложений.

Для удаления загрязнения РНКазаой с поверхностей стола, одноразовой пластиковой посуды и лабораторного оборудования рекомендуется использовать RNaseZap® (Кат.№AM9780) от Ambion®. Загрязнение РНКазаой может быть альтернативно удалено с использованием обычных лабораторных реагентов. Для дезактивации пластиковой посуды промойте 0,1 М NaOH, 1 мМ ЭДТА, а затем водой без РНКазаы или промойте хлороформом, если пластиковая посуда устойчива к хлороформу. Чтобы очистить резервуары для электрофореза, очистите их моющим средством (например, 0,5% SDS), промойте без РНКазаы водой, промойте этанолом (если резервуары устойчивы к этанолу) и дайте высохнуть.

Одноразовая пластиковая посуда

Неиспользуемые пластиковые изделия должны быть обработаны перед использованием, чтобы убедиться, что они не содержат РНКазы. Пластиковую посуду следует тщательно промыть 0,1 М NaOH, * 1 мМ ЭДТА *, а затем водой без РНКазы. В качестве альтернативы, устойчивую к хлороформу пластиковую посуду можно промыть хлороформом для инактивации РНКаз.

Изделия из стекла

Стеклянная посуда должна быть обработана перед использованием, чтобы убедиться, что она не содержит РНКазы. Стеклянная посуда, используемая для работы с РНК, должна быть очищена моющим средством, тщательно ополоснута и прожарена при температуре > 240°C в течение четырех или более часов (в течение ночи, если это более удобно) перед использованием. В качестве альтернативы стеклянную посуду можно обработать DEPC (диэтилпирокарбонатом).

Растворы

Растворы (вода и другие растворы) следует обрабатывать 0,1% DEPC. DEPC является сильным, но не абсолютным ингибитором РНКаз. Обычно его используют в концентрации 0,1% для инактивации РНКаз на стеклянной или пластиковой посуде или для создания растворов, не содержащих РНКаз, и воды. DEPC инактивирует РНКазы путем ковалентной модификации. Добавьте 0,1 мл DEPC к 100 мл раствора, который нужно обработать, и энергично встряхните, чтобы ввести DEPC в раствор. Пусть раствор инкубировать в течение 12 часов при 37°C. Автоклавируйте в течение 15 минут, чтобы удалить любой след DEPC. DEPC будет реагировать с первичными аминами и не может использоваться непосредственно для обработки трис-буферов. DEPC очень нестабилен в присутствии трис-буферов и быстро разлагается на этанол и CO₂. При подготовке трис-буферов сначала обработайте воду DEPC, а затем растворите трис, чтобы получить соответствующий буфер. Следовые количества DEPC модифицируют пуриновые остатки в РНК путем карбетоксилирования. Карбетоксилированная РНК транскрибируется с очень низкой эффективностью в бесклеточных системах. Тем не менее, его способность образовывать гибриды ДНК: РНК или РНК: РНК не подвергается серьезному влиянию, если большая часть пуриновых остатков не была модифицирована.

Остаточный DEPC всегда следует удалять из растворов или сосудов путем автоклавирования или нагревания до 100°C в течение 15 минут.

Примечание: RNeasy буферы гарантированно не содержат РНКазы без использования DEPC-обработки и, следовательно, не содержат загрязнений DEPC.

Информация для заказа

Продукт	Описание	Кат.№
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute спин-колонок, пробирки для элюции, пробирки для отмывки, пробирки для лизиса, реагенты без РНКаз, буферы	73604

Справочники и руководства пользователя по наборам QIAGEN доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены у технической службы QIAGEN или у местного дистрибьютора.

Заказ www.qiagen.com/shop

Техническая поддержка support.qiagen.com

Веб-сайт www.qiagen.com

Руководство по использованию набора QIAasymphony® DSP Virus/Pathogen Kit

 192 (каталожный номер 937036)

 96 (каталожный номер 937055)

Версия 1
для диагностики *in vitro*



QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit

QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit



937036, 937055



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R5  1058143EN



Эта страница намеренно оставлена пустой.

Содержание

Назначение	4
Обзор и пояснения	4
Принцип процедуры	5
Предоставляемые материалы	6
Состав наборов	7
Необходимые материалы, не входящие в состав набора	8
Меры предосторожности	9
Условия транспортировки и хранения реагентов	12
Сбор и подготовка биологического материала	12
Процедура	13
Автоматическое выделение на станции QIAasympphony SP	13
Протокол:	
□ Общий протокол выделения	19
Руководство по устранению неполадок	22
Контроль качества	25
Ограничения	25
Контактная информация	26
Информация для заказа	27

Назначение

Наборы QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit и QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit используют технологию магнитных частиц для автоматического выделения и очистки ДНК из образцов биологического материала.

Наборы предназначены для использования профессиональными пользователями (врачи, лаборанты, научные сотрудники), которые обучены молекулярно-биологическим методам.

Наборы предназначены для диагностики *in vitro*.

Обзор и пояснения

Наборы QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Kits предназначены для использования только на приборе QIAasymphony SP. Наборы предоставляют реагенты для полностью автоматизированной и одновременной очистки вирусных нуклеиновых кислот. Наборы могут использоваться для очистки нуклеиновых кислот широкого спектра ДНК и РНК-содержащих вирусов, а также бактериальной ДНК из грамотрицательных и грамположительных бактерий. Однако рабочие характеристики для каждого вида вируса или бактерии не установлены и должны быть подтверждены пользователем. Технология магнитных частиц позволяет очистить высококачественные нуклеиновые кислоты, которые не содержат белков, нуклеаз и других примесей. Очищенные нуклеиновые кислоты готовы для непосредственного использования в последующих процессах, таких как амплификация или другие ферментативные реакции. QIAasymphony SP выполняет все этапы процедуры очистки. До 96 образцов, партиями до 24, обрабатываются за один прогон.

Принцип процедуры

Технология QIAasymphony сочетает в себе скорость и эффективность очистки нуклеиновых кислот на основе диоксида кремния с удобной обработкой магнитными частицами (рис. 1). Процедура очистки предназначена для обеспечения безопасного и воспроизводимого обращения с потенциально инфекционными образцами и включает 4 этапа: лизис, связывание, промывание и элюирование (см. Блок-схему). Пользователь может выбирать между различными объемами элюции.

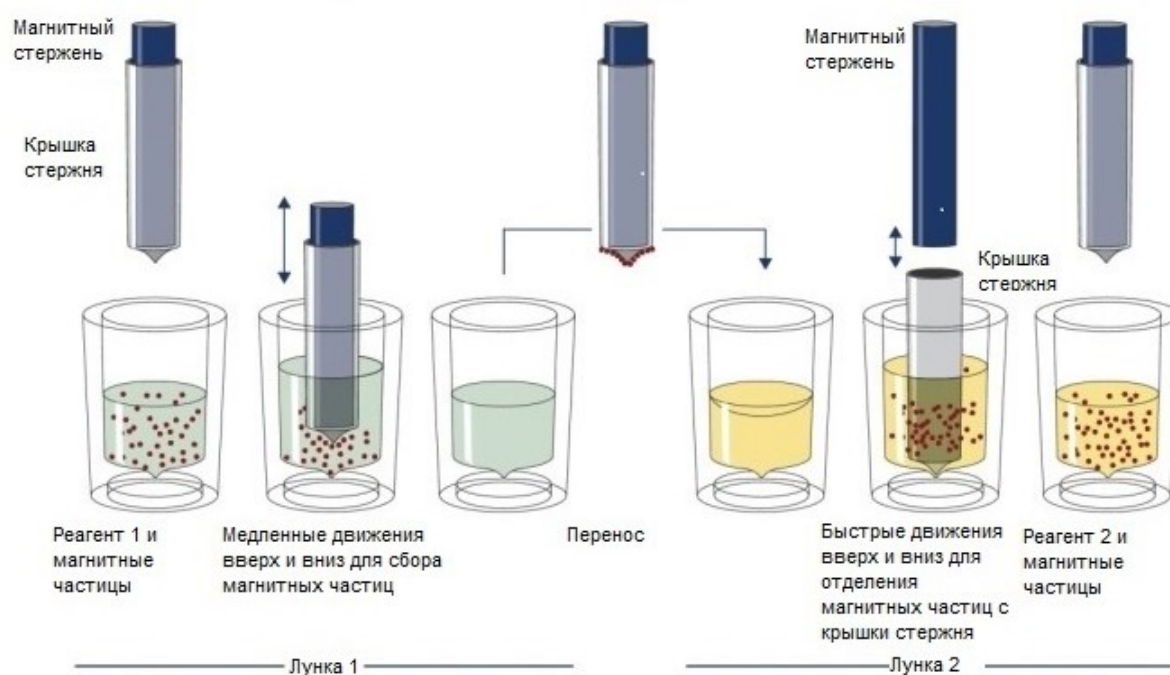
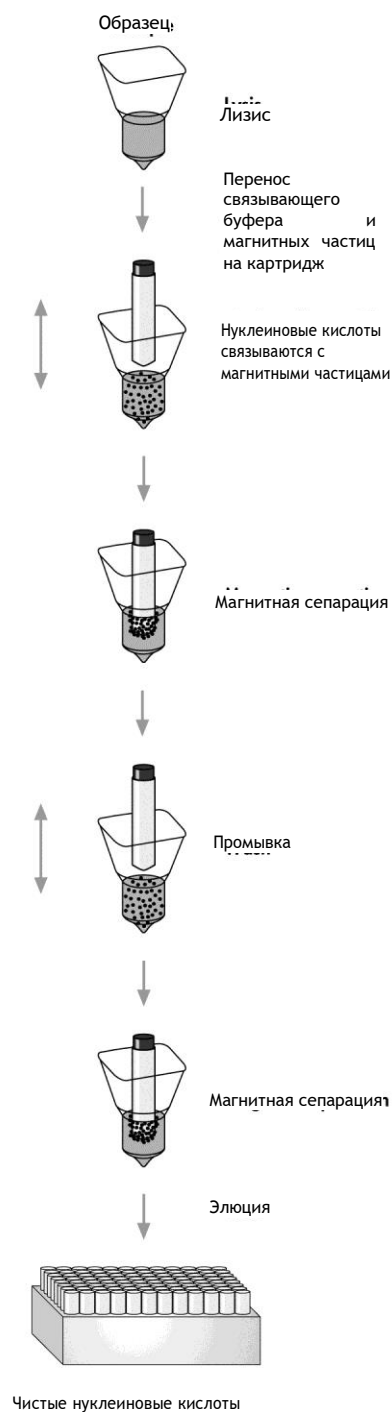


Рисунок 1. Схема принципа QIAasymphony SP. QIAasymphony SP обрабатывает образец, содержащий магнитные частицы, следующим образом: магнитный стержень, защищенный крышкой для стержня, входит в лунку, содержащую образец, и притягивает магнитные частицы. Покрывало для стержня расположено над другой лункой, и магнитные частицы высвобождаются. QIAasymphony SP использует магнитную головку, содержащую 24 магнитных стержней, и поэтому может обрабатывать до 24 образцов одновременно. Шаги 1 и 2 повторяются несколько раз во время обработки образца.

Процедура



Полностью автоматизированная очистка нуклеиновых кислот на станции QIAprep DSP

Предоставляемые материалы

Состав наборов

Набор QIAasymphony DSP Virus/Pathogen			Mini	Midi
Каталожный номер			937036	937055
Количество реакций*			192	96
RC	Картридж с реагентами [†]	REAG CART	2	2
ER	Стойка для ферментов		2	2
PL	Крышка для штатива		2	2
AVE	Буфер AVE (20 мл) [‡]		2	2
AVE	Буфер AVE (2 мл) [‡]	ELU BUF	2	2
CARRIER	Носитель РНК		2 x 1350 мкг	2 x 1350 мкг
RSS	Набор полосок для повторного использования [§]		2	2
	Руководство пользователя		1	1

* Количество реакций зависит от используемого протокола.

[†] Содержит соли гуанидина. Не совместим с дезинфектантами содержащими отбеливатель.

[‡] Содержит азид натрия в качестве консерванта.

[§] Набор полосок (RSS) содержит 8 полосок.

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

- ☐ Картриджи для образцов, 8-ми луночные (кат.номер 997002)
- ☐ Наконечники для магнитных стержней (кат.номер 997004)
- ☐ Наконечники с фильтрами, 200 мкл и 1500 мкл (кат.номер 990332 и 997024)
- ☐ Пробирки для образцов (см. Соответствующий протокол доступный на www.qiagen.com/goto/dsphandbooks)
- ☐ Вортекс

Для протоколов pathogen complex

- ☐ Буфер ATL (кат.номер 939016)

Для использования внутренних контролей

- ☐ Пробирки для образцов, 14 мл 17 x 100 мм полистироловые, круглодонные пробирки от Corning (кат.номер 352051, www.corning.com)

Важно: BD был предыдущим поставщиком кат.№ 352051 и Corning, Inc. является новым поставщиком.

- ☐ Пробирки для проб объемом 2 мл, с завинчивающимися крышками или без завинчивающихся крышек от Sarstedt (например, кат. № 72.693 и 72.694, www.sarstedt.com)

Меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*.

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety, где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буферы в картридже с реагентами (RC) содержат соли гуанидина, которые могут образовывать высокореактивные соединения в сочетании с отбеливателем. Если буферы пролиты, очистите их подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% (v/v) гипохлоритом натрия.

Следующие заявления об опасности и мерах предосторожности относятся к компонентам наборов QIASymphony DSP Virus/Pathogen.

Буфер QSB1



Содержит: Бридж 58; гуанидинтиоцианат; изопропиловый спирт. Опасность! Может быть вредным при проглатывании или при контакте с кожей. Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. Может вызвать сонливость и головокружение. Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. При контакте с кислотами выделяется очень токсичный газ. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжайте промывать. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или на волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой. Немедленно позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или врачу. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Держать контейнер плотно закрытым. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

MBS

Предупреждение! Вызывает легкое раздражение кожи. При раздражении кожи обратиться к врачу.

Протеиназа К



Содержит: протеиназу К. Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии, астмы или затруднение дыхания. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / брызг. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При появлении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. ПРИ ВДЫХАНИИ: Если дыхание затруднено, выведите пострадавшего на свежий воздух и держите в покое в удобном для дыхания положении. Носите респиратор для защиты.

QSL2



Содержит: Бридж 58; гуанидинтиоцианат; изопропиловый спирт. Опасность! Может быть вредным при проглатывании или при контакте с кожей. Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. Может вызвать сонливость и головокружение. Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. При контакте с кислотами выделяется очень токсичный газ. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжайте промывать. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или на волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой. Немедленно позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или врачу. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Держать контейнер плотно закрытым. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

QSW1



Содержит: этанол; гидрохлорид гуанидина; хлорид лития. Предупреждение! Может быть вреден при проглатывании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Легковоспламеняющаяся жидкость и пары. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

QSW2



Содержит: этанол. Опасность! Вызывает серьезное раздражение глаз. Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

QSW5



Содержит: этанол; гидрохлорид гуанидина. Опасность! Может быть вредным при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Условия транспортировки и хранения реагентов

Наборы QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Kits следует хранить в при комнатной температуре (15-25°C). Магнитные частицы в картридже для реагентов (RC) остаются активными при этой температуре. Не храните картриджи с реагентами (RC) при температуре ниже 15°C.

Храните лиофилизированный носитель РНК (CARRIER) и буфер AVE (AVE) при комнатной температуре.

Наборы QIAasymphony DSP Virus / Pathogen содержат готовый раствор протеиназы К, который можно хранить при комнатной температуре.

При правильном хранении набор стабилен до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить не более 4 недель, что обеспечивает экономичное повторное использование реагентов и более гибкую обработку образцов. Если картридж с реагентами (RC) используется частично, замените крышку емкости, содержащей магнитные частицы, и запечатайте картридж с реагентами (RC) прилагаемыми полосками для повторного использования сразу после окончания цикла, чтобы избежать испарения.

Запуск партий с низким количеством образцов (<24) потенциально сократит общее количество образцов, возможных на картридж.

Чтобы избежать испарения реагента, картридж с реагентом (RC) может быть открыт не более 15 часов (включая время работы) при максимальной температуре окружающей среды 30°C.

Избегайте воздействия на картриджи с реагентами (RC) ультрафиолетового излучения (например, используемого для дезактивации), так как воздействие может вызвать ускоренное старение картриджей с реагентами (RC) и буферов.

Примечание. На этикетке в окне QIAasymphony DSP Virus / Pathogen Kit указана дата истечения срока действия набора. Файл результатов документирует даты истечения срока годности только для картриджа с реагентами (RC) и буфера ATL.

Сбор и подготовка биологического материала

Не допускать образования пены в образцах или на них. В зависимости от исходного материала может потребоваться предварительная обработка образца. Образцы должны быть доведены до комнатной температуры (15-25°C) перед началом цикла.

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре (включая информацию о пробирках для проб, которые можно использовать с определенными протоколами) и о конкретной предварительной обработке проб см. Соответствующий лист протокола, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Процедура

Автоматическая очистка на станции QIAasympphony SP

QIAasympphony SP делает автоматизированную пробоподготовку легкой и удобной. Образцы, реагенты и расходные материалы, а также элюаты разделяются в разных отсеках. Просто загрузите образцы, реагенты, поставляемые в специальных картриджах, и предварительно уложенные расходные материалы в соответствующий отсек перед выполнением. Запустите протокол и удалите очищенную ДНК из отсека для элюции после обработки. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к Вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.

Примечание. Дополнительное обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется для снижения риска контаминации.

Диапазон доступных протоколов постоянно расширяется, протоколы QIAGEN можно бесплатно загрузить с www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Загрузка картриджа с реагентами (RC) в отсек «Реагенты и расходные материалы» (“Reagents and Consumables”)

Реагенты для очистки ДНК содержатся в картридже для реагентов (RC) (рис. 2). Каждая лунка картриджа с реагентами (RC) содержит определенный реагент, такой как магнитные частицы, связывающий буфер, промывочный буфер или элюирующий буфер. Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно использовать повторно, что позволяет избежать образования отходов из-за остатков реагентов в конце процедуры очистки.



Рисунок 2. Картридж с реагентами QIAasympphony (RC). Картридж с реагентами (RC) содержит все реагенты, требуемые для запуска протокола.

Перед началом процедуры необходимо убедиться, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Снимите лоток с магнитными частицами с рамки картриджа с реактивами, энергично встряхните его в течение не менее 3 минут, затем поместите его обратно перед первым использованием. Поместите картридж с реагентами (RC) в держатель картриджа с реагентами. Перед первым использованием картриджа с реактивами (RC) установите крышку (PL) поверх картриджа с реактивами (RC).

Примечание: крышка (PL) острая. Будьте осторожны при установке на картридж с реагентами (RC). Убедитесь, что крышка (PL) установлена на картридж с реагентами (RC) в правильной ориентации.

После того как крышка лотка с магнитными частицами снята, картридж с реагентами (RC) загружается в отсек «Реагенты и расходные материалы».

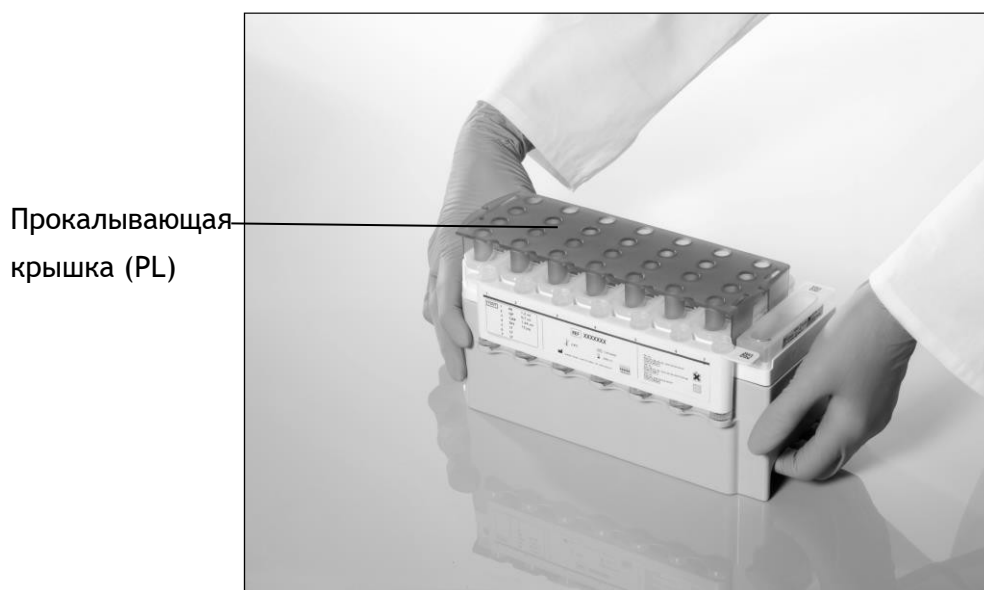


Рисунок 3. Простая подготовка рабочего стола с картриджами для реагентов (RC).

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить, см. «Хранение и обращение с реагентами».

Загрузка пластиковых расходных материалов в отсек «Реагенты и расходные материалы»

Картриджи для подготовки образца, крышки стержней (обе предварительно установлены в коробках) и одноразовые наконечники с фильтрами (наконечники 200 мкл в синих штативах и 1500 мкл в серых штативах) загружаются в отсек для реагентов и расходных материалов.

Примечание: убедитесь, что крышки боксов сняты, прежде чем загружать их в отсек «Реагенты и расходные материалы».

Примечание. В наконечниках есть фильтры, предотвращающие перекрестное загрязнение.

Слоты для штативов с наконечниками на рабочем столе QIASymphony SP могут быть заполнены штативами любого типа. QIASymphony SP определит тип наконечников, загруженных во время сканирования инвентаря.

Примечание. Не перезаправляйте штативы с наконечниками, боксы для картриджей, покрытия для стержней перед началом следующего запуска протокола. QIASymphony SP может использовать частично заполненные единицы.

Необходимые расходные материалы см. в соответствующем листе протокола, доступном по адресу www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Загрузка отсека «Отходы» (“Waste”)

Картриджи для подготовки образцов и крышки стержней, используемые во время запуска, складываются в отсек для отходов. Убедитесь, что ящик для отходов содержит достаточно места для отходов, образующихся во время выполнения протокола.

Примечание: убедитесь, что крышки боксов для отходов сняты перед загрузкой боксов в отсек для отходов. Если вы используете коробки для 8-стержневых крышек для сбора использованных картриджей для образцов и 8-стержневых крышек, убедитесь, что распорная коробка была удалена.

Пакет для сброса наконечников должен быть прикреплен к передней части отсека для отходов.

Примечание. Наличие пакета для сброса наконечников не проверяется системой. Перед началом выполнения протокола убедитесь, что пакет правильно прикреплен. Очистите пакет после обработки максимум 96 образцов, чтобы избежать застревания наконечников.

Контейнер для отходов собирает жидкие отходы, образующиеся в процессе очистки. Отсек для отходов можно закрыть, только если контейнер для отходов находится на месте. Утилизируйте жидкие отходы в соответствии с местными правилами безопасности и охраны окружающей среды. Не автоклавируйте заполненную бутылку для отходов. Опорожните емкость для отходов после того, как будет обработано не более 96 образцов.

Загрузка отсека «Элюат» (“Eluate”)

Загрузите требуемый штатив в отсек для элюции. Поскольку длительное хранение элюатов в отсеке может привести к испарению элюатов, мы настоятельно рекомендуем использовать только слот 1 с соответствующими охлаждающими адаптерами.

Сканирование инвентаря

Перед началом цикла прибор проверяет, что в соответствующие отсеки загружено достаточное количество расходных материалов для поставленной в очередь партии.

Подготовка образцов биоматериала

Наборы QIAasympyphony DSP Virus/Pathogen Kits предназначены для автоматической очистки общей ДНК из плазмы, сыворотки, СМЖ, респираторных и урогенитальных образцов. Не допускайте образования пены в образцах или на них. В зависимости от исходного материала возможно потребуются предварительная пробоподготовка. Образцы должны быть доведены до комнатной температуры (15-25 °C) перед началом цикла.

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре (включая информацию о пробирках для проб, которые можно использовать с определенными протоколами) и о конкретной предварительной обработке проб см. Соответствующий лист протокола, который можно найти на сайте www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Подготовка смеси носителя РНК (CARRIER)–буфера AVE (AVE)

Примечание: мы настоятельно рекомендуем использовать РНК-носитель (CARRIER). Если РНК-носитель (CARRIER) не добавляется, восстановление нуклеиновых кислот может быть значительно снижено. Чтобы приготовить исходный раствор РНК-носителя (CARRIER), добавьте 1350 мкл буфера AVE (AVE) (поставляется во флаконах по 2 мл) в пробирку, содержащую 1350 мкг лиофилизированного РНК-носителя (CARRIER), чтобы получить раствор 1 мкг / мкл. Тщательно растворите РНК-носитель, разделите смесь на аликвоты удобного размера и храните при 2-8 °C до 4 недель.

Объемы РНК-носителя (CARRIER), необходимые для конкретных протоколов, см. в соответствующем листе протокола, доступном по адресу www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Расчет объема смеси РНК-носителя (CARRIER) на пробирку

Минимальный объем смеси РНК-носителя (CARRIER) и буфера AVE (AVE) должен включать достаточный дополнительный объем, чтобы учесть потери жидкости из-за пипетирования и испарения. Совместимые форматы пробирок, включая минимальный объем смесей РНК-носителя (CARRIER) и буфера AVE (AVE), перечислены на сайте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Пробирки, содержащие смеси РНК-носитель (CARRIER) - буфер AVE (AVE), помещают в пробирку-носитель. Носитель для пробирок, содержащий смесь(и) РНК-носителя (CARRIER) -буфер AVE (AVE), должен быть помещен в слот А отсека для образцов. В каждой партии можно использовать до 8 пробирок смеси, а в серии из 4 порций можно использовать до 24 пробирок.

Если было показано, что меньшее количество РНК-носителя (CARRIER) лучше для вашей системы амплификации, отрегулируйте объем РНК-носителя (CARRIER) соответствующим образом. Использование различной концентрации РНК-носителя (CARRIER) должно быть подтверждено для каждого конкретного типа образца и последующего анализа.

Если РНК-носитель (CARRIER) не используется, пробирки, загруженные в слот А, должны содержать только буфер AVE (AVE) (120 мкл буфера AVE (AVE) на образец).

Использование внутреннего контроля

Использование QIAAsymphony DSP Virus / Pathogen Kits в сочетании с системами амплификации, которые используют внутренний контроль, может потребовать введения этих внутренних контролей в процедуру очистки для контроля эффективности подготовки образца и последующего анализа.

Внутренний контроль должен быть добавлен со смесью РНК-носитель (CARRIER) -Buffer AVE (AVE), а общий объем смеси РНК-носитель (CARRIER) - Buffer AVE (AVE) остается 120 мкл.

Количество добавляемого внутреннего контроля зависит от системы анализа и объема элюции, выбранного в протоколе QIAAsymphony SP. Расчет и проверка должны быть выполнены пользователем. Обратитесь к инструкциям производителя для последующего анализа, чтобы определить оптимальную концентрацию внутреннего контроля. Использование концентрации, отличной от рекомендованной, может привести к неверным результатам, особенно если для расчета титров используется внутренний контроль.

Смесь внутренних контролей может быть использована для анализа различных параметров из одного элюата. Совместимость различных внутренних средств контроля должна быть подтверждена пользователем.

При расчете количества используемого внутреннего контроля, а также титра обработанного образца необходимо учитывать фактический объем раствора для элюции, который используется для каждого образца. Поскольку небольшие количества жидкости теряются во время переноса и контакта с магнитными частицами, начальный объем раствора для элюирования должен быть больше, чем выбранный объем, чтобы гарантировать, что конечный элюат имеет правильный объем. Соответствующий лист протокола, доступный по адресу www.qiagen.com/goto/dsphandbooks, содержит начальные объемы элюирования, чтобы обеспечить точный расчет для внутреннего контроля и титра. В протоколе также содержится информация для расчета объема смеси внутреннего контроля в соответствии с типом используемой пробирки. Мы рекомендуем готовить свежие смеси для каждого запуска непосредственно перед использованием.

Аналитические контрольные наборы

Аналитические контрольные наборы (Assay Assay Control Sets) используются для каждого протокола, даже если не используются внутренние контроли. Для каждого протокола предварительно установлен контрольный набор по умолчанию. Создание дополнительных Assay Control Sets описано в Руководстве пользователя *QIASymphony Management Console User Manual*.

Примечание. При использовании стандартных Assay Control Sets, разработанных для работы без внутреннего контроля, все еще необходимо использование смеси РНК-носитель (CARRIER) -буфер AVE (AVE).

Обработка РНК

Рибонуклеазы (РНКазы) являются очень стабильными и активными ферментами, которые обычно не требуют кофакторов для функционирования. Поскольку РНКазы трудно инактивировать, и для уничтожения РНК достаточно лишь незначительного количества, не используйте никакие пластмассовые или стеклянные изделия без предварительного устранения возможного загрязнения РНКазой. Следует соблюдать большую осторожность, чтобы избежать случайного введения РНКаза в образец РНК во время или после процедуры очистки.

Выход нуклеиновых кислот

Элюаты, приготовленные с РНК-носителем (CARRIER), могут содержать гораздо больше РНК-носителя (CARRIER), чем нуклеиновых кислот-мишеней. Мы рекомендуем использовать методы количественной амплификации для определения выхода.

Хранение нуклеиновых кислот

Очищенную ДНК можно хранить при температуре 2-8°C до 24 часов. Для длительного хранения — при температуре -20°C.

Протокол: Общий протокол выделения

Ниже приведен общий протокол для использования наборов QIAasymphony DSP Virus/Pathogen. Подробная информация по каждому протоколу представлена в листах протоколов, которые можно загрузить по адресу www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Важные заметки перед началом работы

- ☐ Убедитесь, что вы знакомы с работой QIAasymphony SP. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к Вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.
- ☐ Дополнительное техническое обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется.
- ☐ Убедитесь, что вы знакомы с листом протокола, соответствующим используемой процедуре (www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). В частности, обратите внимание на начальные объемы элюции, необходимые для точного расчета внутреннего контроля и титра, а также инструкции для расчета объема смеси внутреннего контроля в соответствии с типом используемой пробирки. Также проверьте, требует ли протокол буфера ATL.
- ☐ Перед первым использованием картриджа с реагентом убедитесь, что в буферах QSL1 и QSB1 нет осадка. При необходимости извлеките лотки, содержащие буферы QSL1 и QSB1, из картриджа с реагентами и инкубируйте в течение 30 минут при 37 °C с периодическим встряхиванием для растворения осадка. Если картридж с реагентами уже прорезан, убедитесь, что лотки герметизированы с помощью полосок повторного использования, и инкубируйте весь картридж с реагентами в течение 30 минут при 37 °C с периодическим встряхиванием на водяной бане.
- ☐ Избегайте энергичного встряхивания картриджа с реагентами (RC), иначе может образоваться пена, что приведет к проблемам с обнаружением уровня жидкости.
- ☐ Перед запуском протокола, который требует буфер ATL, проверьте, не образовался ли осадок. При необходимости растворите осадок нагреванием до 70 °C при осторожном перемешивании на водяной бане.

До начала работы

- ☐ Подготовьте все необходимые смеси, в том числе смеси, содержащие РНК-носитель (CARRIER) и внутренний контроль (необязательно), непосредственно перед началом.
- ☐ Перед началом убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Встряхните емкость, содержащую магнитные частицы, в течение не менее 3 минут перед первым использованием.
- ☐ Убедитесь, что крышка (PL) установлена на картридже с реагентами (RC) и крышка лотка с магнитными частицами снята, или, если вы используете частично использованный картридж с реактивами (RC), убедитесь, что полоски для запечатывания были удалены.

- ☐ Перед загрузкой картриджа с реагентами (RC) снимите крышку с лотка, содержащего магнитные частицы, и откройте пробирки с ферментом. Убедитесь, что фермент уравновешен до комнатной температуры (15-25 ° C). Убедитесь, что прокалывающая крышка (PL) установлена на картридже с реагентами (RC) или, если вы используете частично использованный картридж с реактивами, убедитесь, что полосы повторного использования были сняты.
- ☐ Если образцы помечены штрих-кодами, сориентируйте образцы в держателе для пробирок так, чтобы штрих-коды были обращены к считывателю штрих-кодов с левой стороны QIAasymphony SP.

Для получения информации о пробирках, совместимых с определенным протоколом, см. список лабораторного оборудования, который можно найти на www.qiagen.com/goto/dsphandbooks).

Процедура

1. Закройте все отсеки и крышки.
2. Включите QIAasymphony SP и дождитесь завершения инициализации процедуры “Sample Preparation”. Выключатель находится в левом нижнем углу QIAasymphony SP. Switch on the QIAasymphony SP, and wait until the “Sample Preparation” screen appears and the initialization procedure has finished.
3. Войдите в меню.
4. Убедитесь, что отсек для отходов подготовлен надлежащим образом, и выполните сканирование отсека для отходов. При необходимости замените пакет для утилизации наконечников.
5. Загрузите необходимый штатив для элюции в отсек для элюата. Используйте только “Elution slot 1” с соответствующим охлаждающим адаптером. При использовании 96-луночного планшета убедитесь, что планшет в правильной ориентации, т.к. неправильная ориентация может привести к перемешиванию образцов в последующих реакциях.
6. Если используется протокол, который не требует буфер ATL, перейдите к шагу 8. Если используется протокол, который требует буфер ATL, нажмите кнопку «R+C» на сенсорном экране, чтобы открыть экран, отображающий состояние расходных материалов («Расходные материалы/8-Крышки стержней/пробирки/наконечники с фильтрами/картриджи с реагентами»). Нажмите кнопку «Scan Bottle», чтобы отсканировать штрих-код буфера ATL с помощью ручного сканера штрих-кода. Нажмите «ОК».

Перед началом сканирования инвентаря убедитесь, что буфер ATL отсканирован, открыт и помещен в положение, указанное на сенсорном экране. В противном случае сканирование инвентаря должно быть повторено после помещения буфера ATL в отсек «Реагенты и расходные материалы».

7. Проведите сканирование отсека «Реагенты и расходные материалы».
8. Поместите образцы в соответствующий держатель для образцов и загрузите их в отсек для образцов.

9. Поместите пробирку(-и), содержащую смесь РНК-носитель (CARRIER)-буфер AVE (AVE) (включая дополнительный внутренний контроль) в держатель пробирки и загрузите в слот А отсека «Образец».

10. Используя сенсорный экран, введите необходимую информацию для каждой партии образцов, подлежащих обработке.

Введите следующую информацию:

- Информация об образце
- Требуемый протокол
- Объем элюции и положение выхода
- Пробирки, содержащие смесь РНК-носителя (CARRIER)-буфер AVE (AVE) (включая дополнительный внутренний контроль).

После того, как информация о партии была введена, статус изменяется с «ЗАГРУЖЕНО» на «В ОЧЕРЕДИ». Как только одна партия ставится в очередь, появляется кнопка «Выполнить».

11. Нажмите кнопку «Выполнить», чтобы начать процедуру.

Все этапы обработки полностью автоматизированы. В конце запуска протокола состояние изменяется с «В РАБОТЕ» на «ЗАВЕРШЕНО».

12. Извлеките штатив для элюции, содержащую очищенную ДНК, из отсека для элюции.

ДНК готова к использованию или может храниться при температуре 2-8°С до 24 часов, и при -20°С, или -80°С более 24 часов.

Штатив для элюции следует вынуть из отсека для сразу после окончания работы. В зависимости от температуры и влажности на элюирующих планшетах, оставленных в QIAasympyphony SP после завершения пробега, может происходить конденсация или испарение.

Файлы результатов создаются для каждого планшета.

Примечание. Убедитесь, что для последующих применений используется правильный объем элюата.

13. Если картридж с реагентами (RC) используется только частично, закройте его прилагаемыми полосками для запечатывания для повторного использования. Использованный буфер ATL закройте и храните при 15-25°С.

14. Утилизируйте использованные пробирки, планшеты и отходы в соответствии с местными правилами техники безопасности.

15. Очистите QIAasympyphony SP.

Следуйте инструкциям по обслуживанию в руководствах пользователя, прилагаемых к Вашему прибору. Обязательно регулярно чистите прибор, чтобы минимизировать риск перекрестного загрязнения.

16. Закройте отсеки и выключите QIAasympyphony SP.

Руководство по устранению неполадок

Это руководство по устранению неполадок может помочь в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Для получения дополнительной информации см. также страницу часто задаваемых вопросов в нашем Центре технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Ученые Технической службы QIAGEN всегда рады ответить на любые ваши вопросы, касающиеся информации или протоколов, приведенных в данном руководстве, или технологий проб и анализа (www.qiagen.com).

Комментарии и предложения

Общее

Сообщение об ошибке на экране

При возникновении сообщений об ошибке на экране обратитесь к руководству пользователя вашего прибора.

Преципитация реагентов в открытом картридже

а) Испарение буфера

Чрезмерное испарение может привести к увеличению концентрации соли в буферах. Выбросьте картридж с реагентами (RC). Обязательно запечатайте буферные лотки частично использованного картриджа с реагентами (RC) с помощью полосок для повторного использования.

б) Хранение картриджа с реагентами (RC)

Хранение картриджа с реагентами (RC) при температуре ниже 15 °C может привести к образованию осадков. При необходимости удалите лотки, содержащие буфер QSL1 и QSB1 из картриджа с реагентами (RC) и инкубируйте на водяной бане при 37 °C в течение 30 минут с периодическим встряхиванием для растворения осадка. Если картридж с реагентами (RC) уже прорезан, убедитесь, что лоток закрыт с помощью полоски для повторного использования, и инкубируйте весь картридж с реагентами (RC) на водяной бане при 37 °C в течение 30 минут с периодическим встряхиванием.

Низкий выход

нуклеиновых кислот

- | | |
|---|---|
| a) Магнитные частицы не были полностью ресуспендированы | Перед началом процедуры убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Интенсивно встряхивайте не менее 3 минут перед использованием. |
| b) Замороженные образцы не были перемешаны после разморозки | Разморозить замороженные образцы крови или лейкоцитарной пленки с легким перемешиванием, чтобы обеспечить тщательное перемешивание |
| c) Не добавлен РНК-носитель | Восстановите РНК-носитель (CARRIER) в буфере AVE (AVE) и смешайте с соответствующим объемом буфера AVE (AVE), как описано в разделе «Подготовка смесей РНК-носителя (CARRIER) - буфера AVE (AVE)». Повторите процедуру очистки с новыми образцами |
| d) Деградация нуклеиновых кислот | Образцы хранились неправильно или подвергались слишком большому количеству циклов замораживания-оттаивания. Повторите процедуру очистки с новыми образцами. |
| e) Неполный лизис образца | Перед использованием убедитесь, что в буфере QSL1 и QSB1 нет осадков. При необходимости извлеките лотки, содержащие буферы QSL1 и QSB1, из картриджа с реагентами (RC) и инкубируйте на водяной бане в течение 30 минут при 37°С с периодическим встряхиванием для растворения осадка. Если картридж с реагентами (RC) уже прорезан, убедитесь, что лотки закрыты с помощью повторно используемых уплотнительных полос, и инкубируйте весь картридж с реагентами (RC) в течение 30 минут при 37°С с периодическим встряхиванием в водяной бане. |

Комментарии и предложения

f) Засорение
наконечника
нерастворёнными
частицами

Нерастворимый материал не удаляли из образца до начала процедуры очистки QIAasympyphony.

Чтобы удалить нерастворимый материал, центрифугируйте образец при 3000 × g в течение 1 минуты и переносите супернатант в новую пробирку для образцов. При необходимости используйте процедуры предварительной обработки, как описано в соответствующих листах протокола, например, для вязких образцов материалов. Протоколы доступны на сайте www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия наборов QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Kit проверяется на соответствие заранее установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

Эффективность системы была установлена в исследованиях по оценке эффективности очистки вирусной ДНК и РНК из сыворотки, плазмы или спинномозговой жидкости человека и очистки вирусной ДНК и РНК, а также бактериальной ДНК от респираторных и урогенитальных образцов. Образцы крови, обработанные активатором сывороточного сгустка, могут привести к снижению выхода вирусных нуклеиновых кислот. Не используйте пробирки для сбора крови Greiner Bio-One® VACUETTE®, содержащие Z-активатор сывороточного сгустка.

Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности системы для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями по оценке эффективности QIAGEN.

Чтобы свести к минимуму риск негативного влияния на результаты диагностики, следует использовать соответствующие средства контроля при последующих применениях. Для дальнейшей проверки рекомендуется руководство Международной конференции по согласованию технических требований (ICH) в ICH Q2 (R1) Валидация аналитических процедур: текст и методология.

Любые результаты диагностики должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими или лабораторными данными.

Контактная информация

В QIAGEN мы гордимся качеством и доступностью нашей технической поддержки. Наши отделы технического обслуживания укомплектованы опытными учеными, обладающими обширными практическими и теоретическими знаниями в области технологий отбора проб и анализа и использования продуктов QIAGEN. Если у вас есть какие-либо вопросы или трудности с использованием набора QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit, набора QIAAsymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit или продуктов QIAGEN, пожалуйста, не стесняйтесь обращаться к нам.

Клиенты QIAGEN являются основным источником информации о продвинутом или специализированном использовании наших продуктов. Эта информация полезна для других ученых, а также для исследователей QIAGEN. Поэтому мы рекомендуем вам связаться с нами, если у вас есть какие-либо предложения по поводу производительности продукта или новых приложений и методы.

Для получения технической помощи и получения дополнительной информации посетите наш Центр технической поддержки по адресу www.qiagen.com/Support или позвоните в один из отделов технического обслуживания QIAGEN или к местным дистрибьюторам.

Информация для заказа

Продукт	Состав	Кат.номер
QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Mini Kit (192)	Для 192 образцов ДНК: 2 картриджа с реагентами, емкости для ферментов и аксессуары	937036
QIAasymphony DSP Virus/Pathogen Midi Kit (96)	Для 96 образцов ДНК: 2 картриджа с реагентами, емкости для ферментов и аксессуары	937055
Связанные продукты		
Buffer ATL (4 x 50 ml)	4 x 50 мл буфера ATL для сложных протоколов	939016
QIAGEN Proteinase K (2 ml)	2 мл (>600 mAU/ml, раствор)	19131
QIAGEN Proteinase K (10 ml)	10 мл (>600 mAU/ml, раствор)	19133
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Картриджи для использования на QIAasymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Покрытия для стержней для использования на QIAasymphony SP	997004
Reagent Cartridge Holder (2)	Держатель картриджа для реагентов для использования на QIAasymphony SP	997008
Accessory Trough (10)	Дополнительные лотки для использования с QIAasymphony SP	997012
Tip Disposal Bags (15)	Пакеты для сброса наконечников для использования на QIAasymphony SP	9013395
Cooling Adapter, MTP, RB, v2, Qsym	Охлаждающий адаптер для круглодонных микропланшетов (MTP). Для использования с модулями QIAasymphony	9020729

Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Охлаждающий адаптер для ЕМТ. Для использования в отсеке элюирования с модулями QIASymphony	9020730
Cooling Adapter, PCR, v2, Qsym	Охлаждающий адаптер для ПЦР планшетов. Для использования с модулями QIASymphony	9020732
Cooling Adapter, 2 ml, v2, Qsym	Охлаждающий адаптер для пробирок с завинчивающейся крышкой 2 мл. Для использования в отсеке элюирования	9020674
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Штативы с наконечниками 200 мкл (8 x 128) для использования на QIAcube и QIASymphony SP	990332
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	Штативы с наконечниками 1 500 мкл (8 x 128) для использования на QIASymphony SP	997024
Reuse Seal Set (20)	Наборы уплотнителей для повторного использования частично использованных картриджей с реагентами QIASymphony	997006
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Нестерильные полипропиленовые пробирки (максимальная емкость 0,85 мл, емкость хранения менее 0,7 мл, емкость элюции 0,4 мл); 2304 в штативах по 96; включает крышки	19588

Эта страница намеренно оставлена пустой

Эта страница намеренно оставлена пустой

Эта страница намеренно оставлена пустой

www.qiagen.com

Australia □ techservice-au@qiagen.com

Austria □ techservice-at@qiagen.com

Belgium □ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil □ suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada □ techservice-ca@qiagen.com

China □ techservice-cn@qiagen.com

Denmark □ techservice-nordic@qiagen.com

Finland □ techservice-nordic@qiagen.com

France □ techservice-fr@qiagen.com

Germany □ techservice-de@qiagen.com

Hong Kong □ techservice-hk@qiagen.com

India □ techservice-india@qiagen.com

Ireland □ techservice-uk@qiagen.com

Italy □ techservice-it@qiagen.com

Japan □ techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) □ techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg □ techservice-bnl@qiagen.com

Mexico □ techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands □ techservice-bnl@qiagen.com

Norway □ techservice-nordic@qiagen.com

Singapore □ techservice-sg@qiagen.com

Sweden □ techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland □ techservice-ch@qiagen.com

UK □ techservice-uk@qiagen.com

USA □ techservice-us@qiagen.com



Руководство по использованию наборов QIAasymphony® DSP DNA Kits



192 (cat. no. 937236)



96 (cat. no. 937255)

Версия 1



Для диагностики *in vitro*

QIAasymphony DSP DNA Mini Kit

QIAasymphony DSP DNA Midi Kit



937236, 937255



QIAGEN GmbH
QIAGEN Strasse 1
40724 Hilden GERMANY



1069185



Содержание

Назначение набора	3
Пояснения	3
Процедура	3
Предоставляемые материалы	6
Состав набора	6
Необходимые материалы, не входящие в состав набора	6
Меры предосторожности	7
Условия транспортировки и хранения реагентов	10
Сбор и подготовка биологического образца	11
Процедура	12
Протокол: Выделение ДНК	18
Контроль качества	21
Ограничения	21
Символы	22
Руководство по устранению неполадок	24
Приложение: Количественная оценка и определение чистоты ДНК	27
Информация для заказа	29

Назначение набора

Наборы QIAasymphony® DSP DNA Mini Kit и QIAasymphony DSP DNA Midi Kit использует технологию магнитных частиц для автоматического выделения и очистки ДНК из образцов биологического материала.

Набор предназначен для использования профессиональными пользователями (врачи, лаборанты, научные сотрудники), которые обучены молекулярно-биологическим методам.

Набор QIAasymphony DSP DNA Kit предназначен для диагностики *in vitro*.

Пояснения

Наборы QIAasymphony DSP DNA Kits предназначены для использования только на приборе QIAasymphony SP. Наборы QIAasymphony DSP DNA Kits предоставляют реагенты для полностью автоматизированной и одновременной очистки общей ДНК из цельной крови человека, лейкоцитов и тромбоцитов, тканей и FFPE-тканей, а также вирусной ДНК из цельной крови человека. Однако рабочие характеристики для каждого вируса, ткани или ткани FFPE не установлены и должны быть подтверждены пользователем.

Технология магнитных частиц позволяет очистить высококачественные нуклеиновые кислоты, которые не содержат белков, нуклеаз и других примесей. Очищенные нуклеиновые кислоты готовы для непосредственного использования для амплификации или других ферментативных реакций. QIAasymphony SP выполняет все этапы процедуры очистки. До 96 образцов, из 24 партий, обрабатываются за один прогон. Протоколы для тканей и FFPE требуют предварительной обработки образцов вручную.

Процедура

Технология QIAasymphony сочетает в себе скорость и эффективность очистки нуклеиновых кислот на основе анионного обмена с удобной обработкой магнитными частицами (рис. 1). Процедура очистки предназначена для обеспечения безопасного и воспроизводимого обращения с потенциально инфекционными образцами и включает 3 этапа: связывание, промывание и элюирование (см. Блок-схему). Пользователь может выбрать объем вводимого образца.

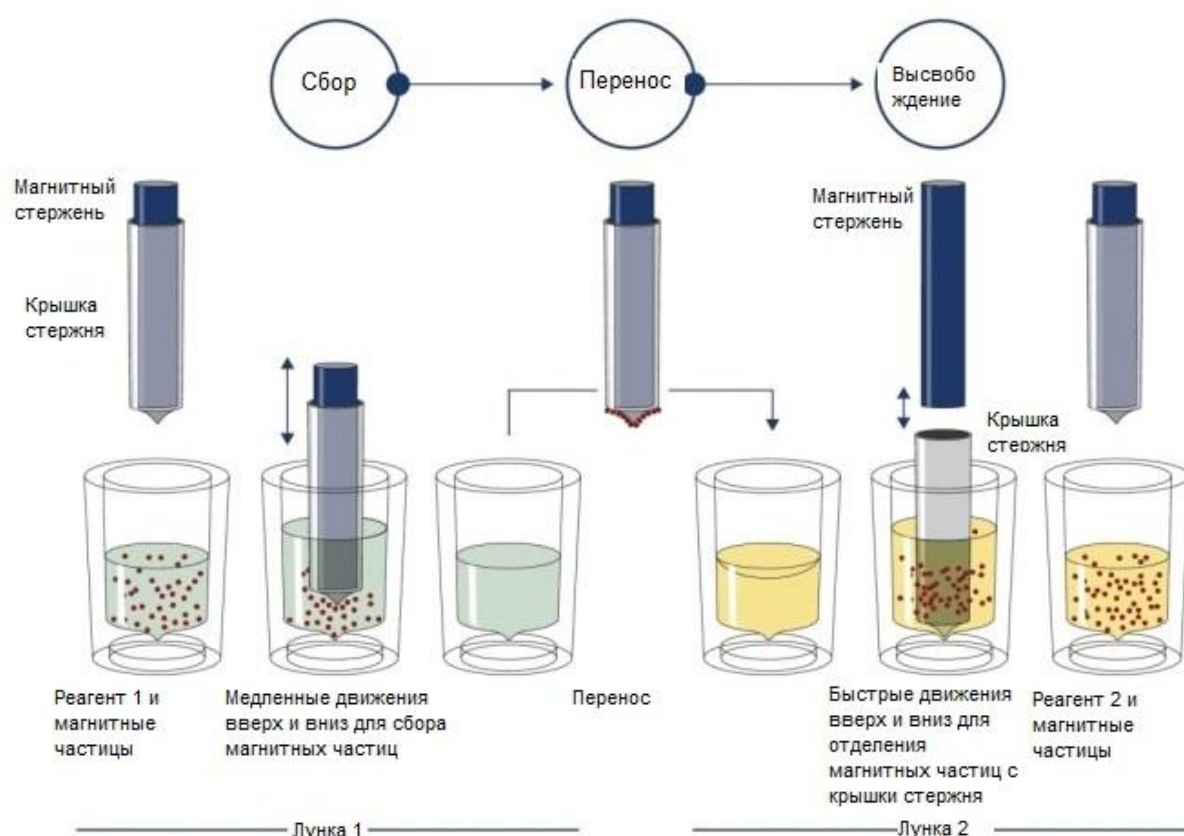


Рисунок 1. Схема принципа QIAasymphony SP. QIAasymphony SP обрабатывает образец, содержащий магнитные частицы, следующим образом: магнитный стержень, защищенный покрытием для стержня, входит в лунку, содержащую образец, и притягивает магнитные частицы. Покрытие для стержня расположено над другой лункой, и магнитные частицы высвобождаются. QIAasymphony SP использует магнитную головку, содержащую 24 магнитных стержней, и поэтому может обрабатывать до 24 образцов одновременно. Шаги 1 и 2 повторяются несколько раз во время обработки образца.

Процедура



Предоставляемые материалы

Состав набора

Набор QIAasymphony DSP DNA Kit		Mini	Midi
Каталожный номер		937236	937255
Количество реакций		192	96
RC	Картридж с реагентами	2	2
ER	Стойка для ферментов	2	2
PL	Крышка для штатива	2	2
ATE	Буфер ATE (20 мл)	20 мл	20 мл
RSS	Набор полосок для повторного использования	2	2
	Руководство пользователя	1	1

* Для приготовления 96 x 1000 мкл или 144 x 400 мкл.

† Содержит соли гуанидина. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель.

‡ Содержит азид натрия в качестве консерванта.

§ Набор для повторного использования содержит 8 полосок для повторного использования.

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

- QIAasymphony SP (кат.№ 9001297)
- Картридж для подготовки образцов, 8-луночный (кат.№ 997002)
- 8 крышек стержня (кат.№ 997004)

- Наконечники с фильтрами, 200 мкл 1 500 мкл (кат.№990332 и 997024)
- Пробирки. Совместимые форматы пробирок см. в списке лабораторного оборудования, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com.
- Пробирки или планшеты для элюции. Совместимые форматы пробирок и планшетов см. в списке лабораторного оборудования, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com.
- Фосфатно-солевой буфер (PBS, может потребоваться для доведения пробы до нужного объема)
- Вортекс
- Необязательно: DNase-free RNase A (для минимизации содержания РНК)
- Дополнительные материалы см. на www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*.

Перед использованием набора обязательно прочтите инструкции по технике безопасности.

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety , где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буферы в картридже с реагентами (RC) содержат соли гуанидина, которые могут образовывать высокореактивные соединения в сочетании с отбеливателем. Если буферы пролиты, очистите их подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты,

очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия.

Следующие заявления об опасности и мерах предосторожности относятся к компонентам набора QIAasympphony DSP DNA Kits.

QSB1



Содержит: Бридж 58; гуанидинтиоцианат; изопропиловый спирт. Опасность! Может быть вредным при проглатывании или при контакте с кожей. Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. Может вызвать сонливость и головокружение. Вредно для водных организмов с долгосрочными последствиями. Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. При контакте с кислотами выделяется очень токсичный газ. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжайте промывать. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или на волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой. Немедленно позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или врачу. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Держать контейнер плотно закрытым. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

MBS

Предупреждение! Вызывает легкое раздражение кожи. При раздражении кожи обратиться к врачу.

Протеиназа К



Содержит: протеиназу К. Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии, астмы или затруднение дыхания. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / брызг. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При появлении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. ПРИ ВДЫХАНИИ: Если дыхание затруднено, выведите пострадавшего на свежий воздух и держите в покое в удобном для дыхания положении. Носите респиратор.

QSL1



Содержит: гуанидин гидрохлорид; малеиновая кислота
Предупреждение! Может быть вредным при проглатывании или вдыхании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Может вызывать аллергическую кожную реакцию. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

QSW1



Содержит: этанол; гидрохлорид гуанидина; хлорид лития. Предупреждение! Может быть вреден при проглатывании. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Легковоспламеняющаяся жидкость и пары. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. Снять загрязненную одежду и выстирать ее перед повторным использованием. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

QSW2



Содержит: этанол. Опасность! Вызывает серьезное раздражение глаз. Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Условия транспортировки и хранения реагентов

Наборы QIASymphony DSP DNA Kits следует хранить в вертикальном положении при комнатной температуре (15–25°C) для сохранения активности магнитных частиц. При правильном хранении набор стабилен до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Примечание. На этикетке на коробке отображается срок годности набора. Файл результатов документирует даты истечения срока годности только для картриджа с реагентами (RC).

Компоненты набора

Набор QIAasymphony DSP DNA Kits содержит готовую к употреблению протеиназу K, которая хранится при комнатной температуре.

Не храните картриджи с реагентами (RC) при температуре ниже 15°C.

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить не более 4 недель, что обеспечивает экономичное повторное использование реагентов и более гибкую обработку образцов. Если картридж с реагентами (RC) используется частично, замените крышку емкости, содержащей магнитные частицы, и запечатайте картридж с реагентами (RC) прилагаемыми полосками для повторного использования сразу после окончания цикла, чтобы избежать испарения.

Чтобы избежать испарения реагента, картридж с реагентом (RC) может быть открыт не более 15 часов (включая время работы) при максимальной температуре окружающей среды 30°C.

Запуск партий с низким количеством образцов (<24) увеличит как время, в течение которого картридж с реактивами (RC) открыт, так и требуемые объемы буфера, потенциально уменьшая общее количество проб на картридж.

Избегайте воздействия на картриджи с реагентами (RC) ультрафиолетового излучения (например, используемого для дезактивации), так как воздействие может вызвать ускоренное старение картриджей с реагентами (RC) и буферов.

Сбор и подготовка биологического образца

Не допускать образования пены в образцах или на них. В зависимости от исходного материала может потребоваться предварительная обработка образца.

Образцы должны быть доведены до комнатной температуры (15–25°C) перед началом цикла.

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре (включая информацию о пробирках для проб, которые можно использовать с определенными протоколами) и о конкретной предварительной обработке проб см. Соответствующий лист протокола, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com.

Процедура

Автоматическая очистка на QIAasympphony SP

QIAasympphony SP делает автоматизированную пробоподготовку легкой и удобной. Образцы, реагенты и расходные материалы, а также элюаты разделяются в разных отсеках. Просто загрузите образцы, реагенты, поставляемые в специальных картриджах, и предварительно уложенные расходные материалы в соответствующий отсек перед выполнением. Запустите протокол и удалите очищенную ДНК из отсека для элюции после обработки. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.

Примечание. Дополнительное обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется для снижения риска контаминации.

Диапазон доступных протоколов постоянно расширяется, протоколы QIAGEN можно бесплатно загрузить с www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Загрузка картриджей с реагентами (RC) в отсек «Реагенты и расходные материалы»

Реагенты для очистки ДНК содержатся в картридже для реактивов (RC) (рис. 2). Каждая лунка картриджа с реагентами (RC) содержит определенный реагент, такой как магнитные частицы, связывающий буфер, промывочный буфер или элюирующий буфер. Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно использовать повторно, что позволяет избежать образования отходов из-за остатков реагентов в конце процедуры очистки.

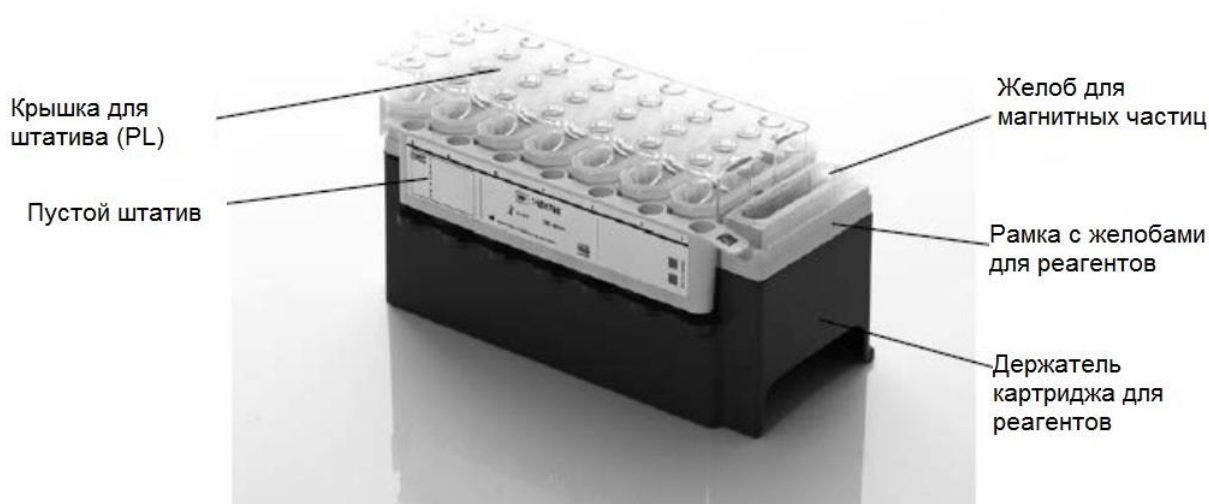


Рисунок 2. QIAasympphony картридж с реагентами (RC). Картридж с реагентами (RC) содержит все реагенты, необходимые для выполнения протокола.

Перед началом процедуры убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Снимите лоток с магнитными частицами с рамки картриджа с реагентами, энергично встряхните его в течение не менее 3 минут, затем поместите его обратно перед первым использованием. Поместите картридж с реагентами (RC) в держатель картриджа с реагентами. Перед первым использованием картриджа с реагентами (RC) установите крышку (PL) поверх картриджа с реагентами (RC).

Примечание: крышка (PL) острая. Будьте осторожны при установке на картридж с реагентами (RC). Убедитесь, что крышка (PL) установлена на картридж с реагентами (RC) в правильной ориентации.

После того как крышка лотка с магнитными частицами снята, картридж с реагентами (RC) затем загружается в отсек «Реагенты и расходные материалы».

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить, см. «Хранение и обращение с реагентами».

Загрузка пластика в отсек «Реагенты и расходные материалы»

Картриджи для подготовки образца, крышки стержней (обе предварительно установлены в коробках) и одноразовые наконечники с фильтрами (наконечники 200 мкл в синих штативах и 1500 мкл в серых штативах) загружаются в отсек для реагентов и расходных материалов.

Примечание: убедитесь, что крышки боксов сняты, прежде чем загружать их в ящик «Реагенты и расходные материалы».

Примечание. В наконечниках есть фильтры, предотвращающие перекрестное загрязнение.

Слоты для штативов с наконечниками на рабочем столе QIAasymphony SP могут быть заполнены штативами любого типа. QIAasymphony SP определит тип наконечников, загруженных во время сканирования инвентаря.

Примечание. Не перезаряжайте штативы с наконечниками, боксы для картриджей, покрытия для стержней перед началом следующего запуска протокола. QIAasymphony SP может использовать частично заполненные единицы.

Примечание. В наконечниках есть фильтры, предотвращающие перекрестное загрязнение.

Необходимые расходные материалы см. в соответствующем листе протокола, доступном по адресу www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Загрузка отсека для отходов

Картриджи для подготовки образцов и крышки стержней, используемые во время пробега, складываются в отсек для отходов. Убедитесь, что ящик для отходов содержит достаточно места для отходов, образующихся во время выполнения протокола.

Примечание: убедитесь, что крышки боксов для отходов сняты перед загрузкой боксов в отсек для отходов.

Пакет для сброса наконечников должен быть прикреплен к передней части отсека для отходов.

Примечание. Наличие пакета для сброса наконечников не проверяется системой. Перед началом выполнения протокола убедитесь, что пакет правильно прикреплен. Очистите пакет после обработки максимум 96 образцов, чтобы избежать застревания наконечников.

Контейнер для отходов собирает жидкие отходы, образующиеся в процессе очистки. Отсек для отходов можно закрыть, только если контейнер для отходов находится на месте. Утилизируйте жидкие отходы в соответствии с местными правилами безопасности и охраны окружающей среды. Не автоклавируйте заполненную бутылку для отходов. Опорожните емкость для отходов после того, как будет обработано не более 96 образцов.

Загрузка отсека для элюции

Загрузите требуемый штатив в отсек для элюции. Поскольку длительное хранение элюатов в отсеке может привести к испарению элюатов, мы настоятельно рекомендуем использовать только слот 1 и адаптеры охлаждения.

Сканирование

Перед началом цикла прибор проверяет, что в соответствующие отсеки загружено достаточное количество расходных материалов для поставленной в очередь партии.

Подготовка образцов биоматериала

Наборы QIAasympyphony DSP DNA Kits предназначены для автоматической очистки общей ДНК из цельной крови человека, лейкоцитарной пленки, свежих тканей и тканей, фиксированных формалином и парафином (FFPE), а также вирусной ДНК из цельной крови человека.

Не допускайте образования пены в образцах или на них. В зависимости от исходного материала может потребоваться предварительная обработка образца. Образцы должны быть доведены до комнатной температуры (15–25°C) перед началом цикла. Протоколы для тканей и FFPE требуют предварительной обработки образцов вручную.

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре (включая информацию о пробирках для проб, которые можно использовать с определенными протоколами) и о конкретной предварительной обработке проб см. Соответствующий лист протокола, который можно найти на сайте www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Выход очищенной ДНК

Выходы ДНК зависят от типа образца, количества ядродержащих клеток в образце, качества исходного материала и протокола, используемого для выделения ДНК. Элюция в меньших объемах увеличивает конечную концентрацию ДНК в элюате, но немного снижает общий выход ДНК. Мы рекомендуем использовать объем элюции, соответствующий предполагаемому последующему применению. QIAasymphony DSP DNA Kits («Наборы ДНК DSP») выделяют и РНК и ДНК, если оба присутствуют в образце. Чтобы минимизировать содержание РНК в образце, добавьте к образцу РНКазу А на этапе, указанном в соответствующем протоколе предварительной обработки. Для получения дополнительной информации обратитесь к листам протокола по адресу www.qiagen.com/goto/dspdnakits.

Хранение ДНК

Очищенную ДНК можно хранить при температуре 2–8°C до 5 дней. Для длительного хранения — при температуре -20°C или при -80°C.

Таблица 1. Обзор протокола

Образец	Объем образца (мкл)	Объем элюции (мкл)	Набор	Протокол
Цельная кровь	200	50, 100, 200	Mini	Blood 200 DSP
	400	100, 200, 400	Midi	Blood 400 DSP
	1000	200, 400, 500	Midi	Blood 1000 DSP
Лейкоцитарная пленка	200	200, 300, 400	Mini	DNA Buffy Coat 200 DSP
	400	200, 400	Midi	DNA Buffy Coat 400 DSP
Вирусы	200	60, 85, 110, 165	Mini	VirusBlood200 DSP
Ткани	200	50, 100, 200, 400	Mini	Tissue LC 200 DSP
	200	100, 200, 400	Mini	Tissue HC 200 DSP

Важные заметки перед началом работы:

- Убедитесь, что вы знакомы с работой QIAasymphony SP. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.
- Дополнительное техническое обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется.
- Перед началом процедуры ознакомьтесь с разделом «Процедура», стр. 4.
- Убедитесь, что вы знакомы с листом протокола, соответствующим используемой процедуре (www.qiagen.com/goto/dspdnakits).
- Перед первым использованием картриджа с реагентом убедитесь, что в буферах QSL1 и QSB1 нет осадка. При необходимости извлеките желоба, содержащие буферы QSL1 и QSB1, из картриджа с реагентами и инкубируйте в течение 30 минут при 37°C с периодическим встряхиванием для растворения осадка. Если картридж с реагентами уже прорезан, убедитесь, что впадины герметизированы с помощью полосок повторного использования, и инкубируйте весь картридж с реагентами в течение 30 минут при 37°C с периодическим встряхиванием в водяной бане.

- Избегайте энергичного встряхивания картриджа с реагентами (RC), иначе может образоваться пена, что приведет к проблемам с обнаружением уровня жидкости.

До начала работы:

- Перед началом убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Встряхните емкость, содержащую магнитные частицы, в течение не менее 3 минут перед первым использованием.
- Убедитесь, что крышка (PL) установлена на картридже с реагентами (RC) и крышка лотка с магнитными частицами снята, или, если вы используете частично использованный картридж с реагентами (RC), убедитесь, что полоски для запечатывания были удалены.
- Убедитесь, что пробирки для ферментов открыты.
- Если образцы помечены штрих-кодами, сориентируйте образцы в держателе для пробирок так, чтобы штрих-коды были обращены к считывателю штрих-кодов с левой стороны QIASymphony SP.
- Для получения информации о пробирках, совместимых с определенным протоколом, см. список лабораторного оборудования, который можно найти на www.qiagen.com/goto/dspdnakits.
- Информацию о минимальных объемах в пробирках для определенного протокола см. в соответствующем листе протокола (доступно по адресу www.qiagen.com/goto/dspdnakits).

Протокол: Выделение ДНК

Ниже приведен общий протокол использования наборов QIASymphony DSP. Подробная информация для каждого протокола, включая объемы образцов и пробирки, представлена в листах протоколов, которые можно найти на странице продукта на www.qiagen.com.

1. Закройте все отсеки и крышки.
2. Включите QIASymphony SP и дождитесь завершения инициализации процедуры.

Выключатель находится в левом нижнем углу QIASymphony SP.

3. Войдите в меню.
4. Убедитесь, что ящик для отходов подготовлен надлежащим образом, и выполните сканирование отсеков для отходов. При необходимости замените пакет для утилизации наконечников.
5. Загрузите штатив для элюции в отсек для элюата.
Не загружайте 96-луночный планшет в «Слот для элюции 4». Необходимо использовать «Слот для элюции 1» с соответствующим адаптером охлаждения.
При использовании 96-луночного планшета убедитесь, что он находится в правильной ориентации, так как неправильное размещение может вызвать перепутывание образцов при последующем анализе.
6. Загрузите картридж с реагентами (RC) и расходные материалы в отсек «Реагенты и расходные материалы».
7. Проведите сканирование отсека «Реагенты и расходные материалы».
8. Поместите образцы в соответствующий держатель для образцов и загрузите их в отсек для образцов.

ВАЖНО: Для протоколов VirusBlood200 пробирку(и), содержащую смесь внутреннего контроля и буфера АТЕ, следует поместить в слот А отсека для проб. Для получения дополнительной информации о приготовлении смеси и использовании внутреннего контроля обратитесь к соответствующему листу протокола (доступно по адресу www.qiagen.com/goto/dspdnakits).

9. Используя сенсорный экран, введите необходимую информацию для каждой партии образцов, подлежащих обработке.

Введите следующую информацию:

- Информация об образце
- Требуемый протокол
- Объем элюции и положение выхода
- Для протокола VirusBlood200: пробирки с внутренним контролем

После того, как информация о партии была введена, статус изменяется с «ЗАГРУЗЕНО» на «В ОЧЕРЕДИ». Как только одна партия ставится в очередь, появляется кнопка «Выполнить».

10. Нажмите кнопку «Выполнить», чтобы начать процедуру.

Все этапы обработки полностью автоматизированы. В конце запуска протокола состояние изменяется с «В РАБОТЕ» на «ЗАВЕРШЕНО».

11. Извлеките штатив для элюции, содержащую очищенную ДНК, из отсека для элюции.

12. ДНК готова к использованию или может храниться при температуре 2–8°C, –20°C, или –80°C.

Штатив для элюции следует вынуть из отсека для сразу после окончания пробега. В зависимости от температуры и влажности на элюирующих пластинах, оставленных в QIAasymphony SP после завершения пробега, может происходить конденсация или испарение.

Как правило, магнитные частицы не переносятся в элюаты. Если происходит перенос, магнитные частицы в элюатах не будут влиять на большинство последующих применений. Если необходимо удалить магнитные частицы перед выполнением последующих операций, пробирки или планшеты, содержащие элюаты, следует сначала поместить в подходящий магнит, а элюаты перенести в чистую пробирку (см. Приложение).

Файлы результатов создаются для каждого планшета.

13. Если картридж с реагентами (RC) используется только частично, закройте его прилагаемыми полосками для запечатывания для повторного использования.

14. Утилизируйте использованные пробирки, планшеты и отходы в соответствии с местными правилами техники безопасности.

15. Очистите QIAasymphony SP.

Следуйте инструкциям по обслуживанию в руководствах пользователя, прилагаемых к вашему прибору. Обязательно регулярно чистите прибор, чтобы минимизировать риск перекрестного загрязнения.

16. Закройте отсеки и выключите QIAasymphony SP.

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия наборов QIAasymphony DSP DNA Mini и Midi Kit проверяется на соответствие заранее установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

Эффективность системы была установлена в исследованиях по оценке эффективности выделения общей ДНК из цельной крови человека, лейкоцитарной пленки, свежих тканей и тканей FFPE, а также вирусной ДНК из цельной крови человека.

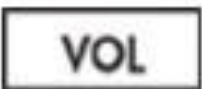
Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности системы для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями по оценке эффективности QIAGEN.

Чтобы свести к минимуму риск негативного влияния на результаты диагностики, следует использовать соответствующие средства контроля при последующих применениях.

Любые результаты диагностики должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими или лабораторными данными.

Символы

Символы в следующей таблице включают символы, используемые в этих инструкциях по применению.

	Содержит количество реагентов для N тестов
	Использовать до
	Для диагностики <i>in vitro</i>
	Каталожный номер
	Номер лота
	Номер материала
	Компоненты
	Количество
	Версия и номер инструкции
	Объем
	Температурные ограничения
	Производитель
	Только для использования с

EC	REP	Авторизованный представитель в Европе
		См. инструкцию пользователя
CONT		Содержит
WELL		Номер ячейки
REAG	CART	Картридж с реагентами
ELU	BUF	Буфер элюции
IPA		Изопропанол
PROTK		Протеиназа К
GTC		Гуанидин тиоционат
GuHCL		Гуанидин гидрохлорид
EtOH		Этанол
MALEIC ACID		Малеиновая кислота
BRU 58		BRU 58
LiCl		Хлорид лития
GTIN		Global Trade Item Number
		Внимание
		Острый

Руководство по устранению неполадок

Это руководство по устранению неполадок может помочь в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Для получения дополнительной информации см. также страницу часто задаваемых вопросов в нашем Центре технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Ученые Технической службы QIAGEN всегда рады ответить на любые ваши вопросы, касающиеся информации или протоколов, приведенных в данном руководстве, или технологий проб и анализа (www.qiagen.com).

Комментарии и предложения	
Общее	
Сообщение об ошибке на экране	При возникновении сообщений об ошибке на экране обратитесь к руководству пользователя вашего прибора.
Преципитация реагентов в открытом картридже	
А) Испарение буфера	Чрезмерное испарение может привести к увеличению концентрации соли в буферах. Выбросьте картридж с реагентами (RC). Обязательно запечатайте буферные желоба частично использованного картриджа с реагентами (RC) с помощью полосок для повторного использования.
Б) Хранение картриджа с реагентами (RC)	Хранение картриджа с реагентами (RC) при температуре ниже 15°C может привести к образованию осадков. При необходимости удалите желоба, содержащие буфер QSL1 и QSB1 из картриджа с реагентами (RC) и инкубируйте на водяной бане при 37°C в течение 30 минут с периодическим встряхиванием для растворения осадка. Если картридж с реагентами (RC) уже прорезан, убедитесь, что впадина закрыта с помощью полоски для повторного использования, и инкубируйте весь картридж с реагентами (RC) на водяной бане при 37°C в течение 30 минут с периодическим встряхиванием.
Низкий выход нуклеиновых кислот	
А) Магнитные частицы не были полностью ресуспендированы	Перед началом процедуры убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Интенсивно встряхивайте не менее 3 минут перед использованием.

	Комментарии и предложения
Б) Замороженные образцы не были перемешаны после разморозки	Разморозить замороженные образцы крови или лейкоцитарной пленки с легким перемешиванием, чтобы обеспечить тщательное перемешивание
В) Неполный лизис образца	Перед использованием убедитесь, что в буфере QSL1 и QSB1 нет осадков. При необходимости извлеките желоба, содержащие буферы QSL1 и QSB1, из картриджа с реагентами (RC) и инкубируйте на водяной бане * в течение 30 минут при 37°C с периодическим встряхиванием для растворения осадка. Если картридж с реагентами (RC) уже прорезан, убедитесь, что впадины закрыты с помощью повторно используемых уплотнительных полос, и инкубируйте весь картридж с реагентами (RC) в течение 30 минут при 37°C с периодическим встряхиванием в водяной бане.
Г) Неполное расщепление образца ткани	Убедитесь, что ткань полностью расщепилась. Можно продлить время инкубации с протеиназой К.
Д) Засорение наконечника нерастворёнными частицами	Нерастворимый материал не удаляли из образца до начала процедуры очистки QIAasympphony. При необходимости используйте процедуры предварительной обработки, как описано в соответствующем листе протокола, который можно найти на вкладке ресурса на странице продукта на www.qiagen.com .
Е) Плохое качество образца при использовании протокола для лейкоцитарной пленки	Убедитесь, что лейкоцитарная пленка была правильно собрана.
Ж) Низкое содержание лейкоцитов в образце цельной крови	При использовании протокола для лейкоцитарной пленки увеличьте объем используемой цельной крови при сохранении исходного объема собранных лейкоцитов.
З) Неполный лизис тканей	Если лизат содержит нерастворимые материалы, увеличьте время инкубации с протеиназой К.
И) Потеря клеток при обработке FFPE ксиленом \ этанолом	Аккуратно проводите предварительную пробоподготовку.

Комментарии и предложения	
ДНК плохо проявляется в последующих реакциях	
А) Недостаточное количество ДНК	Определите количество выделенной ДНК на спектрофотометре при длине волны 260 нм.
Б) Избыток ДНК	Избыток ДНК может ингибировать некоторые ферментные реакции. Определите количество выделенной ДНК на спектрофотометре при длине волны 260 нм.
Низкое соотношение A_{260}/A_{280}	
Показатель поглощения при 320 нм не вычитался из показания поглощения при 260 нм и 280 нм	Чтобы скорректировать наличие магнитных частиц в элюате, необходимо взять показание поглощения при 320 нм и вычесть из показаний поглощения, полученных при 260 нм и 280 нм.

Приложение: Количественная оценка и определение чистоты ДНК

Количественная оценка ДНК

Концентрация ДНК должна быть определена путем измерения поглощения при 260 нм (A_{260}) в спектрофотометре. Показания поглощения при 260 нм должны быть между 0,1 и 1,0, чтобы быть точными. Поглощение 1 единица при 260 нм соответствует 50 мкг ДНК на миллилитр ($A_{260} = 1 = 50 \text{ мкг / мл}$).

Используйте АТЕ-буфер для разбавления образцов и калибровки спектрофотометра.

Соотношение между значениями поглощения при 260 нм и 280 нм дает оценку чистоты ДНК.

Измерьте поглощение при 320, 280 и 260 нм. Вычтите показания поглощения, полученные при 320 нм, из показаний, полученных при 260 и 280 нм, чтобы скорректировать потенциальное присутствие фона.

Используйте следующую формулу для расчета концентрации и выхода ДНК: Концентрация образца ДНК = $50 \text{ мкг / мл} \times (A_{260} - A_{320}) \times \text{коэффициент разбавления}$.
Общее количество очищенной ДНК = концентрация $\times$ объем образца в миллилитрах.

В случае, если магнитные частицы были перенесены в элюат и могут повлиять на последующее применение (например, очищенная ДНК должна быть проанализирована с помощью флуоресцентного капиллярного секвенирования), пробирку, содержащую элюат, следует сначала поместить в подходящий магнитный сепаратор, а элюат перенести в чистую пробирку.

Если необходимо удалить магнитные частицы, поместите пробирку, содержащую ДНК, в подходящий магнитный сепаратор (например, QIAGEN 12-Tube Magnet, кат.№36912), до полного отделения магнитных частиц. Если ДНК находится в микропланшетах, поместите микропланшет на подходящий магнитный сепаратор (например, QIAGEN 96-Well Magnet Type A, кат.№36915) до отделения магнитных частиц. Если подходящий магнитный сепаратор недоступен, центрифугируйте пробирку с ДНК в течение 1 минуты на полной скорости в микроцентрифуге для осаждения любых оставшихся магнитных частиц.

Примечание: для точного количественного определения ДНК методом спектрофотометрии при 260 нм мы рекомендуем развести образец в соответствующем элюирующем буфере. Разбавление образца в воде может привести к неточным значениям. Элюирующий буфер имеет высокий уровень поглощения при 220 нм, что может привести к высоким уровням фонового поглощения, если спектрофотометр не установлен на ноль. Испарение элюатов потенциально увеличивает риск воздействия на результаты измерений, особенно при использовании небольших количеств элюатов в неразбавленном виде. Дополнительный элюирующий буфер для спектрофотометра поставляется в отдельной бутылке с наборами QIAasympyphony DSP DNA Kits.

Чистота ДНК

Чистота определяется путем расчета отношения скорректированной оптической плотности при 260 нм к скорректированной оптической плотности при 280 нм; то есть $(A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$. Чистая ДНК имеет соотношение A_{260} / A_{280} 1,7–1,9.

Информация для заказа

Продукт	Описание	Cat.no
QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)	Для 192 образцов ДНК: 2 картриджа с реагентами, емкости для ферментов и аксессуары	937236
QIASymphony DSP DNA Midi Kit (192)	Для 192 образцов ДНК: 2 картриджа с реагентами, емкости для ферментов и аксессуары	937255
Связанные продукты		
Buffer ATL (4 x 50 ml)	4 x 50 мл буфера ATL для предварительной обработки образцов мочи	939016
Deparaffinization Solution (1 x 50 ml)	1 x 50 мл депарафинизирующего раствора для использования с протоколами QIASymphony для тканей FFPE	939018
Accessory Trough (10)	Дополнительные желоба для использования с QIASymphony SP	997012
Reagent Cartridge Holder (2)	Держатель картриджа для реагентов для использования на QIASymphony SP	997008
Tube Insert, 2 ml, v2, sample carrier, Qsym	Переходник для пробирок (с закручивающейся крышкой 2 мл) для использования на QIASymphony	9242083
Tube Insert, 11 mm, Revision, sample carrier, Qsym	Адаптер (11 мм) для использования на QIASymphony	9242057
Tube Insert, 13 mm, Revision, sample carrier, Qsym	Адаптер (13 мм) для использования на QIASymphony	9242058
Cooling Adapter, 2 ml, v2, Qsym	Адаптер охлаждения для пробирок с закручивающейся крышкой 2 мл. Для использования в отсеке элюирования	9020674
Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Адаптер охлаждения для EMT. Для использования в отсеке элюирования	9020730

Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Картриджи для использования на QIAasympphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Покрытия для стержней для использования на QIAasympphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Штативы с наконечниками 200 мкл (8 x 128) для использования на QIAcube и QIAasympphony SP	990332
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	Штативы с наконечниками 1 500 мкл (8 x 128) для использования на QIAcube и QIAasympphony SP	997024
Tip Disposal Bags (15)	Пакеты для сброса наконечников для использования на QIAasympphony SP	9013395
12-Tube Magnet	Магнит для разделения магнитных частиц в пробирках 12 x 1,5 мл или 2 мл	36912
96-Well Magnet Type A	Магнит для разделения магнитных частиц планшетах, 2 x 96-луночных микропланшетов FB	36915
S-Blocks (24)	96-луночные блоки с 2,2 мл лунками, по 24 в каждом	19585
Reuse Seal Set (20)	Наборы уплотнителей для повторного использования частично использованных картриджей с реагентами QIAasympphony	997006
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Нестерильные полипропиленовые пробирки (максимальная емкость 0,85 мл, емкость хранения менее 0,7 мл, емкость элюции 0,4 мл); 2304 в штативах по 96; включает крышки	19588
QIAasympphony SP	Экстрактор QIAasympphony SP, гарантия 1 год	9001297

Справочники и руководства пользователя по наборам QIAGEN доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены у технической службы QIAGEN или у местного дистрибьютора.

Эта страница специально оставлена пустой

Заказ www.qiagen.com/shop

Техническая поддержка support.qiagen.com

Веб-сайт www.qiagen.com

Руководство по использованию набора QIAasymphony® DSP HPV Media Kit



2x352

Версия 1



Для диагностики *in vitro*



937358



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

R5



1076680EN



Страница оставлена пустой намеренно

Содержание

Назначение набора	4
Пояснения	4
Процедура.....	4
Предоставляемые материалы	7
Состав набора	7
Необходимые материалы, не входящие в состав набора	7
Меры предосторожности	8
Условия транспортировки и хранения реагентов	9
Условия транспортировки и хранения образцов.....	10
Процедура.....	11
Протокол: обработка образцов	16
Руководство по устранению неполадок	20
Контроль качества	21
Ограничения	21
Источники.....	21
Символы.....	22
Контактная информация	23
Информация для заказа	24

Назначение набора

Набор QIAasymphony DSP HPV Media Kit использует технологию магнитных частиц QIAasymphony для автоматизированного выделения клеток шейки матки человека, хранящихся в жидких цитологических средах, для анализа с помощью ДНК-теста *digene*® HC2 High-Risk HPV DNA Test®, обработанного в системе Rapid Capture®. Для получения дополнительной информации о конкретных биологических образцах человека, с которыми был проверен набор, см. Соответствующие листы протокола, доступные в Интернете. на www.qiagen.com/goto/dsphpvmedia.

Набор предназначен для использования профессиональными пользователями (врачи, лаборанты, научные сотрудники), которые обучены молекулярно-биологическим методам.

Набор QIAasymphony DSP HPV Media Kit предназначен для диагностики *in vitro*.

Пояснения

Набор QIAasymphony DSP HPV Media Kit предназначен для полностью автоматизированной подготовки образцов из клеток шейки матки человека, хранящихся в жидких цитологических средах с использованием QIAasymphony SP. Образцы, полученные после выделения набором QIAasymphony DSP HPV Media Kit, готовы к непосредственному использованию с помощью теста *digene*® HC2 High-Risk HPV DNA Test®.

QIAasymphony SP выполняет все шаги процедуры подготовки образца. До 88 образцов, партиями до 24, обрабатываются за один прогон.

Процедура

Технология QIAasymphony сочетает в себе скорость и эффективность рН-управляемой анионообменной хроматографии с удобной обработкой магнитных частиц (Рисунок 1). Процедура очистки предназначена для обеспечения безопасного и воспроизводимого обращения с потенциально инфекционными образцами и включает связывание и восстановление образцов экстрактов (см. Блок-схему).

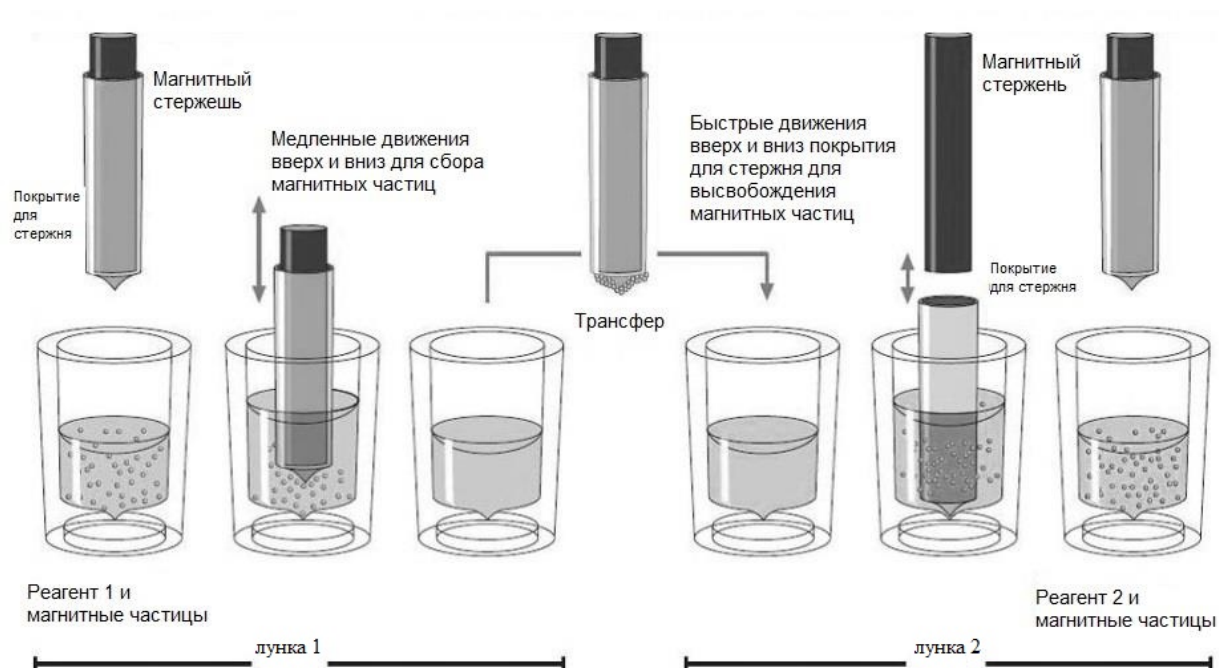


Рисунок 1. Схема принципа QIAasymphony SP. QIAasymphony SP обрабатывает образец, содержащий магнитные частицы, следующим образом: магнитный стержень, защищенный покрытием для стержня, входит в лунку, содержащую образец, и притягивает магнитные частицы. Покрытие для стержня расположено над другой лункой, и магнитные частицы высвобождаются. QIAasymphony SP использует магнитную головку, содержащую 24 магнитных стержней, и поэтому может обрабатывать до 24 образцов одновременно. Шаги 1 и 2 повторяются несколько раз во время обработки образца.

Процедура экстракции на Qsym SP/AS



Предоставляемые материалы

Состав набора

Набор QIAasymphony DSP HPV Media Kit		
Каталожный номер		937358
Количество реакций		2 x 352
RC	Картридж с реагентами	2
PL	Крышка для штатива	2
RSS	Набор для повторного использования*	2
	Руководство пользователя	1

*В набор повторного использования входят 8 полосок для запечатывания.

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

- Картридж для подготовки образцов, 8-луночный (кат. № 997002)
- 8 покрытий для стержня (кат. № 997004)
- Для пробирок с образцами см. Соответствующий лист протокола на вкладке «Ресурсы» комплекта QIAasymphony DSP HPV Media по адресу www.qiagen.com/goto/dsphpvmedia.
- Для извлечения экстракта образца используйте гибридные микропланшеты QIAGEN (кат. № 6000-1203)
- Крышки для микропланшетов QIAGEN (кат. № 6000-5001)
- Мешки для утилизации наконечников (кат. № 9013395)
- Наконечники с фильтрами, 1 500 мкл (кат. № 997024)

- Охлаждающий адаптер, MTP, RB, Qsym для круглодонных микропланшетов (MTP), для использования в отсеке QIASymphony «Eluate» (кат.№ 9018085)

Меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*.

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety, где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Если буфер разлит, промойте подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия.

Следующие сведения об опасности и мерах предосторожности относятся к компонентам наборов QIASymphony DSP HPV Media Kits.

Магнитные частицы AXpHdirect



Содержит: борную кислоту. Опасно! Тератогенно. Влияет на фертильность. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Не работать, пока все меры предосторожности не будут прочитаны и поняты. В случае воздействия обратиться к врачу. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Буфер DNR



Содержит: гидроксид натрия. Опасно! Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. Может вызывать коррозию металлов. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. ГЛАЗА: Осторожно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите

контактные линзы. Продолжайте промывать. КОЖА (или волосы): немедленно снять загрязненную одежду. Промыть кожу водой. Обратиться к врачу. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Буфер STM

Предупреждение! Вызывает легкое раздражение кожи. При раздражении кожи: обратиться к врачу.

Условия транспортировки и хранения реагентов

Набор QIAasympyphony DSP HPV Media Kit следует хранить в вертикальном положении при комнатной температуре (15–25°C). Не храните картриджи с реагентами (RC) при температуре ниже 15°C.

Магнитные частицы в картриджах с реагентами (RC) остаются активными при хранении при этой температуре. При правильном хранении набор стабилен до истечения срока годности, указанного на коробке набора.

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить не более 2 недель, что обеспечивает экономичное повторное использование реагентов и более гибкую обработку образцов. Если картридж с реагентами (RC) используется частично, замените крышку емкости, содержащей магнитные частицы, и запечатайте картридж с реагентами (RC) прилагаемыми полосками для повторного использования сразу после окончания цикла, чтобы избежать испарения.

Чтобы избежать испарения реагента, картридж с реагентом (RC) может быть открыт не более 30 часов (включая время работы) при максимальной температуре окружающей среды 30°C.

Запуск партий с низким количеством образцов (<24) увеличит как время, в течение которого картридж с реактивами (RC) открыт, так и требуемые объемы буфера, потенциально уменьшая общее количество проб на картридж.

Избегайте воздействия на картриджи с реагентами (RC) ультрафиолетового излучения (например, используемого для дезактивации), так как воздействие может вызвать ускоренное старение картриджей с реагентами (RC) и буферов.

Примечание. На этикетке на коробке набора QIAasymphony DSP AXpH указана дата истечения срока действия набора. В файле результатов указываются даты истечения срока годности только для картриджа с реагентами (RC) и жидкости TopElute (TOPE).

Условия транспортировки и хранения образцов

Образцы должны храниться в соответствии с инструкциями производителя для соответствующей транспортной среды и типа образца. Образцы должны быть доведены до комнатной температуры (15–25°C) и перенесены в пробирки непосредственно перед началом цикла.

Не допускать образования пены в образцах или на них. В зависимости от исходного материала может потребоваться подготовка образца.

Для получения дополнительной информации см. соответствующий лист протокола, доступный по адресу www.qiagen.com/goto/dspaxph.

Процедура

Автоматическая очистка на QIASymphony SP

QIASymphony SP делает автоматизированную пробоподготовку легкой и удобной. Образцы, реагенты и расходные материалы, а также элюаты разделяются в разных отсеках. Просто загрузите образцы, реагенты, поставляемые в специальных картриджах, и предварительно уложенные расходные материалы в соответствующий отсек перед выполнением. Запустите протокол и удалите очищенную ДНК из отсека «Eluate» после обработки. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.

Примечание. Дополнительное обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется для снижения риска контаминации.

Примечание. Для процедуры QIASymphony DSP HPV Media требуется версия программного обеспечения 4 или выше.

Загрузка картриджей с реагентами (RC) в отсек «Реагенты и расходные материалы»

Реагенты для очистки ДНК содержатся в картридже для реактивов (RC) (рис. 2). Каждая лунка картриджа с реагентами (RC) содержит определенный реагент, такой как магнитные частицы, лизисный буфер, промывочный буфер или элюирующий буфер. Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно использовать повторно, что позволяет избежать образования отходов из-за остатков реагентов в конце процедуры очистки.



Рисунок 2. QIAasympphony картридж с реагентами (RC). Картридж с реагентами (RC) содержит все реагенты, необходимые для выполнения протокола.

Перед началом процедуры убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Снимите лоток с магнитными частицами с рамки картриджа с реагентами, осторожно переверните его 10 раз (не встряхивайте) и поместите его обратно перед первым использованием. Поместите картридж с реагентами (RC) в держатель картриджа с реагентами. Поместите пустой штатив для ферментов в держатель картриджа с реагентами. Перед первым использованием картриджа с реагентами (RC) установите крышку (PL) поверх картриджа с реагентами (RC) (Рисунок 3).



Рисунок 3. Простая настройка рабочего стола с использованием картриджей для реативов (RC).

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить, см. «Хранение и обращение с реагентами».

Загрузка пластика в отсек «Реагенты и расходные материалы»

Картриджи для подготовки образца, покрытия для стержней (оба предварительно установлены в коробках) и одноразовые наконечники с фильтрами (наконечники 1500 мкл в серых штативах) загружаются в отсек для реагентов и расходных материалов.

Необходимые расходные материалы см. в соответствующем листе протокола, доступном по адресу www.qiagen.com/goto/dspaxph.

Примечание. Не перезаправляйте штативы с наконечниками, боксы для картриджей, покрытия для стержней перед началом следующего запуска протокола. QIAasymphony SP может использовать частично заполненные единицы.

Загрузка отсека для отходов

Картриджи для подготовки образцов и покрытия для стержней, используемые во время пробега, складываются в отсек для отходов. Убедитесь, что ящик для отходов содержит достаточно места для отходов, образующихся во время выполнения протокола.

Примечание: убедитесь, что крышки боксов для отходов сняты перед загрузкой боксов в отсек для отходов.

Пакет для сброса наконечников должен быть прикреплен к передней части отсека для отходов.

Примечание. Наличие пакета для сброса наконечников не проверяется системой. Перед началом выполнения протокола убедитесь, что пакет правильно прикреплен. Очистите пакет после обработки максимум 96 образцов, чтобы избежать застревания наконечников.

Контейнер для отходов собирает жидкие отходы, образующиеся в процессе очистки. Отсек для отходов можно закрыть, только если контейнер для отходов находится на месте. Утилизируйте жидкие отходы в соответствии с местными правилами безопасности и охраны окружающей среды. Не автоклавируйте заполненную бутылку для отходов. Опорожните емкость для отходов после того, как будет обработано не более 96 образцов.

Загрузка отсека для элюции

Загрузите требуемый штатив в отсек для элюции. Поскольку длительное хранение элюатов в отсеке может привести к испарению элюатов, мы настоятельно рекомендуем использовать адаптеры охлаждения.

Сканирование

Перед началом цикла прибор проверяет, что в соответствующие отсеки загружено достаточное количество расходных материалов для поставленной в очередь партии.

Подготовка образцов биоматериала

Наборы QIASymphony DSP HPV Media Kits подходят для образцов, полученных при проведении жидкостной биопсии. Не допускать образования пены в образцах или на них. В зависимости от исходного материала может потребоваться подготовка образца.

Образцы должны храниться в соответствии с инструкциями производителя для соответствующих транспортных сред и типа образца. Образцы должны быть доведены до комнатной температуры (15–25°C) и перенесены в пробирки непосредственно перед началом цикла.

Подробное описание хранения и обращения с образцами см. в соответствующем листе протокола для QIASymphony DSP HPV Media Kit, доступном по адресу www.qiagen.com/goto/dsphpvmedia.

Перенесите образцы в рекомендованные пробирки и поместите образцы в держатель для пробирок. Убедитесь, что вы загрузили достаточный объем образца в QIASymphony. Дополнительную информацию о требованиях к объему образца и утвержденном лабораторном оборудовании см. в соответствующем листе протокола для QIASymphony DSP HPV Media Kit, доступном по адресу www.qiagen.com/goto/dsphpvmedia.

Хранение ДНК

Образцы экстрактов в гибридных микропланшетах QIAGEN (кат. № 6000-1203) можно хранить при температуре 2–8°C в течение времени, описанного в соответствующем протоколе. Во время хранения накрывайте чашки крышкой для микропланшетов QIAGEN (кат. № 6000-5001).

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре и конкретных рекомендациях по хранению экстракта образца см. соответствующий лист протокола для QIAasymphony DSP HPV Media, доступный по адресу www.qiagen.com/goto/dsphpvmedia.

Протокол: обработка образцов

Набор QIASymphony DSP HPV Media Kit разработан для автоматического извлечения клеток шейки матки человека, хранившихся в жидких цитологических средах, для анализа с помощью теста *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Ниже приведен общий протокол для использования QIASymphony DSP HPV Media Kit. Подробная информация по каждому протоколу, включая примеры объемов и требования к подготовке, представлена в листах протоколов, которые можно загрузить по адресу www.qiagen.com/goto/dsphpvmedia.

Важные заметки перед началом работы:

- Самые последние версии Bioscript для использования с QIASymphony DSP HPV Media Kit можно загрузить на вкладке «Ресурсы» по адресу www.qiagen.com/QIASymphony.
- Убедитесь, что вы знакомы с работой QIASymphony SP. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.
- Дополнительное техническое обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется.
- Убедитесь, что вы знакомы с листом протокола, соответствующим используемой процедуре (www.qiagen.com/goto/dsphpvmedia).
- Избегайте энергичного встряхивания картриджа с реагентами (RC), иначе может образоваться пена, что приведет к проблемам с обнаружением уровня жидкости.
- Избегайте сильного встряхивания образцов, в противном случае может образоваться пена, что может привести к проблемам с обнаружением уровня жидкости или пролитию образца.
- Используйте только утвержденное лабораторное оборудование и расходные материалы.
- Если вы запускаете цикл с новым картриджем с реагентами (RC) и проливаете часть суспензии магнитных частиц при снятии крышки, остановите цикл после прокалывания картриджа с реагентами (RC) и перезапустите цикл. Остановка цикла и его повторный запуск означает,

что QIASymphony SP выполнит детектирование уровня жидкости на пробитом картридже с реагентами (RC) и будет измерен оставшийся объем в лотке с магнитными частицами. Невыполнение этого требования может привести к недостаточному объему магнитных частиц.

До начала работы:

- Убедитесь, что крышка (PL) установлена на картридже с реагентами (RC) и крышка лотка с магнитными частицами снята, или, если вы используете частично использованный картридж с реагентами (RC), убедитесь, что полоски для запечатывания были удалены.
- Перемешайте магнитные частицы, осторожно переворачивая 10 раз. Избегайте образования пены, которая может привести к проблемам с обнаружением уровня жидкости.
- Если образцы помечены штрих-кодами, сориентируйте образцы в держателе для пробирок так, чтобы штрих-коды были обращены к считывателю штрих-кодов с левой стороны QIASymphony SP.
- Информацию о минимальных объемах в пробирках для определенного протокола см. в соответствующем листе протокола (доступно по адресу www.qiagen.com/goto/dspaxph).

Процедура

1. Закройте все отсеки и крышки.
2. Включите QIASymphony SP и дождитесь завершения инициализации процедуры.
Выключатель находится в левом нижнем углу QIASymphony SP.
3. Войдите в меню.
4. Убедитесь, что ящик для отходов подготовлен надлежащим образом, и выполните сканирование отсеков для отходов. При необходимости замените пакет для утилизации наконечников.
5. Загрузите картридж с реагентами (RC) и расходные материалы в отсек «Реагенты и расходные материалы».

6. Выполните сканирование инвентаря ящика «Реагенты и расходные материалы».

Примечание. Начните новое сканирование картриджа с реагентами после обработки 88 образцов.

Примечание. Избегайте сканирования картриджа с реагентами через короткие промежутки времени (например, после дополнительной загрузки расходных материалов или после запуска партии из 24 образцов).

7. Загрузите микропланшет в ящик для элюата. Используйте только «слот для элюции 1» с соответствующим адаптером охлаждения.

Убедитесь, что микропланшет находится в правильной ориентации, так как неправильное размещение может привести к перепутыванию проб при последующем анализе. Используйте только утвержденное лабораторное оборудование для QIAasymphony DSP HPV Media Kit.

Примечание. *digene* HC2 HPV High-Risk DNA Test требует, чтобы первый ряд 96-луночного планшета оставался пустым для последующей передачи калибраторов и контролей.

8. Поместите образцы в соответствующий держатель для образцов и загрузите их в отсек для образцов.

9. Используя сенсорный экран, введите необходимую информацию для каждой партии образцов, подлежащих обработке:

- Информация об образце
- Требуемый протокол
- Выходное положение (используйте только «слот элюции 1»)

После того, как информация о партии была введена, статус изменяется с «ЗАГРУЗЕНО» на «В ОЧЕРЕДИ». Как только одна партия ставится в очередь, появляется кнопка «Выполнить».

10. Нажмите кнопку «Выполнить», чтобы начать процедуру очистки.

Все этапы обработки полностью автоматизированы. В конце запуска протокола состояние изменяется с «В РАБОТЕ» на «ЗАВЕРШЕНО».

11. Извлеките штатив для элюции, содержащую очищенную ДНК, из отсека для элюции.

Примечание: микропланшеты следует извлечь из «отсека для элюции сразу после окончания пробега. В зависимости от температуры и влажности, микропланшеты, оставленные в QIAasympphony SP после завершения цикла, могут испытывать конденсацию или испарение.

Примечание: QIAasympphony DSP HPV Media содержит экстракты магнитных частиц. Визуально убедитесь в наличии магнитных частиц. Исклучите образцы экстрактов без видимых количеств магнитных частиц из дальнейшего анализа. Если ящик «Элюат» открывается во время работы (например, если удаляются микропланшеты, содержащие образцы экстрактов), прогон приостанавливается, и необходимо выполнить сканирование инвентаря ящика «Элюат». Обязательно завершите сканирование ящика «Элюат», прежде чем продолжить работу с протоколом. Файлы результатов создаются для каждого микропланшета.

Примечание. Не допускайте разбрызгивания экстрактов образцов при перемещении микропланшета. Накройте планшет крышкой для микропланшетов после извлечения ее из ящика «Элюат».

12. Если картридж с реагентами (RC) используется только частично, закройте его прилагаемыми полосками для запечатывания для повторного использования.
13. Утилизируйте использованные пробирки, планшеты и отходы в соответствии с местными правилами техники безопасности.
14. Очистите QIAasympphony SP.
15. Закройте отсеки и выключите QIAasympphony SP.

Руководство по устранению неполадок

Это руководство по устранению неполадок может помочь в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Для получения дополнительной информации см. также страницу часто задаваемых вопросов в нашем Центре технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Ученые Технической службы QIAGEN всегда рады ответить на любые ваши вопросы, касающиеся информации или протоколов, приведенных в данном руководстве, или технологий проб и анализа (www.qiagen.com).

	Комментарии и предложения
Общее	
А) Сообщение об ошибке на экране	При возникновении сообщений об ошибке на экране обратитесь к руководству пользователя вашего прибора.
Б) Образец не был перенесен	Недостаточный объем образца.
В) Отсутствие магнитных частиц	а) Образец был исключен из обработки. б) Недостаточная гомогенизация суспензии магнитных частиц перед загрузкой. с) Более 88 образцов были заказаны и обработаны без обязательного сканирования инвентаризации.
Преципитация реагентов в открытом картридже	
А) Испарение буфера	Чрезмерное испарение может привести к увеличению концентрации соли в буферах. Выбросьте картридж с реагентами (RC). Обязательно запечатайте буферные желоба частично использованного картриджа с реагентами (RC) с помощью полосок для повторного использования.
Б) Хранение картриджа с реагентами (RC)	Хранение картриджа с реагентами (RC) при температуре ниже 15°C может привести к образованию осадков. При необходимости удалите желоба, содержащие буфер АХрН L1 из картриджа с реагентами (RC) и инкубируйте на водяной бане при 37°C в течение 30 минут с периодическим встряхиванием для растворения осадка. Обязательно замените желоб в правильное положение. Если

	картридж с реагентами (RC) уже прорезан, убедитесь, что желоб закрыт уплотнительной полоской для повторного использования, и инкубируйте весь картридж с реагентами (RC) в водяной бане при 37°C в течение 30 минут с периодическим встряхиванием.
--	--

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия набора QIASymphony DSP HPV Media Kit проверяется на соответствие заранее установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

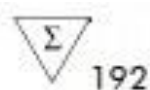
Эффективность системы была установлена в исследованиях по оценке эффективности, выделяющих клетки из образцов шейки матки человека, хранившихся в жидких цитологических средах, описанных в соответствующих листах протоколов в сочетании с *digene* HC2 High-Risk HPV DNA Test.

Источники

QIAGEN поддерживает обширную, актуальную онлайн-базу научных публикаций, использующих продукты QIAGEN. Широкие возможности поиска позволяют вам найти нужные статьи, либо с помощью простого поиска по ключевым словам, либо указав приложение, область исследования, название и т. д.

Для получения полного списка ссылок посетите справочную базу данных QIAGEN в Интернете www.qiagen.com/RefDB/search.asp или обратитесь в службу технической поддержки QIAGEN или к местному дистрибьютору.

Символы



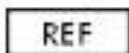
Содержит количество реагентов,
достаточное для обработки 192 образцов



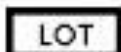
Использовать до



Диагностика *in vitro*



Каталожный номер



Номер лота



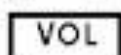
Номер материала



Компоненты



Номер



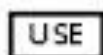
Объем



Температурные ограничения



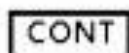
Производитель



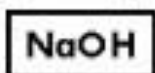
Только для использования с



См. инструкцию



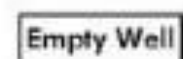
Содержит



Гидроксид натрия



Номер ячейки



Пустая ячейка



Номер Global Trade



Внимание



Острый

Контактная информация

В QIAGEN мы гордимся качеством и доступностью нашей технической поддержки. Наши отделы технического обслуживания укомплектованы опытными учеными, обладающими обширными практическими и теоретическими знаниями в области технологий отбора проб и анализа и использования продуктов QIAGEN. Если у вас возникнут какие-либо вопросы или у вас возникнут какие-либо трудности в отношении комплекта QIAasympHony DSP AXpH DNA или продуктов QIAGEN в целом, пожалуйста, не стесняйтесь обращаться к нам.

Клиенты QIAGEN являются основным источником информации о продвинутом или специализированном использовании наших продуктов. Эта информация полезна для других ученых, а также для исследователей QIAGEN. Поэтому мы рекомендуем вам связаться с нами, если у вас есть какие-либо предложения по поводу производительности продукта или новых приложений и методы.

Для получения технической помощи посетите www.qiagen.com/Support или позвоните в один из отделов технического обслуживания QIAGEN или к местным дистрибьюторам.

Информация для заказа

Продукт	Описание	Cat.no
QIAasymphony DSP HPV Media Kit (2 x 352)	Для 2 x 352 2 картриджа с реагентами и аксессуарами	937358
Связанные продукты		
QIAasymphony SP	Автоматический экстрактор QIAasymphony SP	9001297
<i>digene</i> HC2 High-Risk HPV DNA Test	Для 88 образцов	5197-1330
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Картриджи для использования на QIAasymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Покрывала для стержней для использования на QIAasymphony SP	997004
Reagent Cartridge Holder (2)	Держатель картриджа для реагентов для использования на QIAasymphony SP	997008
Tip Disposal Bags (15)	Пакеты для сброса наконечников для использования на QIAasymphony SP	9013395
Cooling Adapter, MTP, RB, Qsym	Адаптер охлаждения для круглодонных микропланшетов (MTP). Для использования в отсеке для элюции QIAasymphony	9018085
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	Штативы с наконечниками (8 x 128) для использования на QIAcube и QIAasymphony SP	997024
Hybridization Microplate	96-луночные микропланшеты из прозрачного полистирола (100)	6000-1203
Microplate Lids	Крышки для микропланшетов из прозрачного полистирола (100)	6000-5001

Справочники и руководства пользователя по наборам QIAGEN доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены у технической службы QIAGEN или у местного дистрибьютора.

Страница оставлена пустой намеренно

Страница оставлена пустой намеренно

www.qiagen.com

Australia — techservice-au@qiagen.com

Austria — techservice-at@qiagen.com

Belgium — techservice-bnl@qiagen.com

Brazil — suportetecnico.brasil@qiagen.com

Canada — techservice-ca@qiagen.com

China — techservice-cn@qiagen.com

Denmark — techservice-nordic@qiagen.com

Finland — techservice-nordic@qiagen.com

France — techservice-fr@qiagen.com

Germany — techservice-de@qiagen.com

Hong Kong — techservice-hk@qiagen.com

India — techservice-india@qiagen.com

Ireland — techservice-uk@qiagen.com

Italy — techservice-it@qiagen.com

Japan — techservice-jp@qiagen.com

Korea (South) — techservice-kr@qiagen.com

Luxembourg — techservice-bnl@qiagen.com

Mexico — techservice-mx@qiagen.com

The Netherlands — techservice-bnl@qiagen.com

Norway — techservice-nordic@qiagen.com

Singapore — techservice-sg@qiagen.com

Sweden — techservice-nordic@qiagen.com

Switzerland — techservice-ch@qiagen.com

UK — techservice-uk@qiagen.com

USA — techservice-us@qiagen.com



Руководство по использованию набора QIASymphony® DSP Circulating DNA Kit



192

Версия 1



Для диагностики *in vitro*



937556



QIAGEN GmbH,
QIAGEN Strasse 1,
40724 Hilden
GERMANY



1103177



Содержание

Назначение набора	3
Пояснения	3
Процедура	4
Предоставляемые материалы	6
Состав набора	6
Необходимые материалы, не входящие в состав набора	7
Меры предосторожности	8
Условия транспортировки и хранения реагентов	10
Сбор и подготовка биологического образца	11
Процедура	12
Обзор протокола	16
Протокол: Выделение свободноциркулирующей ДНК	17
Контроль качества	20
Ограничения	20
Символы	21
Руководство по устранению неполадок	23
Приложение: Количественное определение неклеточной свободноциркулирующей ДНК	26
Информация для заказа	27

Назначение набора

Набор QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit использует технологию магнитных частиц для автоматического выделения и очистки свободноциркулирующей ДНК человека из биологических образцов.

Набор предназначен для использования профессиональными пользователями (врачи, лаборанты, научные сотрудники), которые обучены молекулярно-биологическим методам.

Набор QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit предназначен для диагностики *in vitro*.

Пояснения

Свободноциркулирующие бесклеточные нуклеиновые кислоты (сфДНК) присутствуют в плазме или моче обычно в виде коротких фрагментов, <1000 п.н. (ДНК) <1000 нт (РНК) или всего 20нт (микроРНК). Концентрация свободноциркулирующих нуклеиновых кислот в биологических жидкостях, таких как плазма или моча, обычно низкая и значительно варьируется между индивидуумами. Для ссфДНК концентрация может составлять 1–100 нг/мл. Набор QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit представляет собой готовую к использованию систему *in vitro* для качественной очистки бесклеточной циркулирующей ДНК человека из плазмы и мочи с использованием прибора QIAasymphony SP.

Набор QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit содержит реагенты для полностью автоматизированной и одновременной очистки человеческой ссфДНК из биологических образцов. Характеристика производительности для каждой пробирки для забора крови не установлена и должна быть подтверждена пользователем. Технология магнитных частиц позволяет высококачественно очищать нуклеиновые кислоты, которые не содержат белков, нуклеаз и других примесей. Очищенная ссфДНК подходит для широкого спектра последующих применений. QIAasymphony SP выполняет все этапы процедуры очистки. До 96 образцов, из 24 партий, обрабатываются за один прогон. Образцы мочи могут потребовать ручной предварительной обработки образцов.

Процедура

Технология QIAasymphony сочетает в себе скорость и эффективность очистки нуклеиновых кислот на основе анионного обмена с удобной обработкой магнитными частицами (рис. 1). Процедура очистки предназначена для обеспечения безопасного и воспроизводимого обращения с потенциально инфекционными образцами и включает 3 этапа: связывание, промывание и элюирование (см. Блок-схему, стр. 5). Пользователь может выбирать объем вводимого образца.

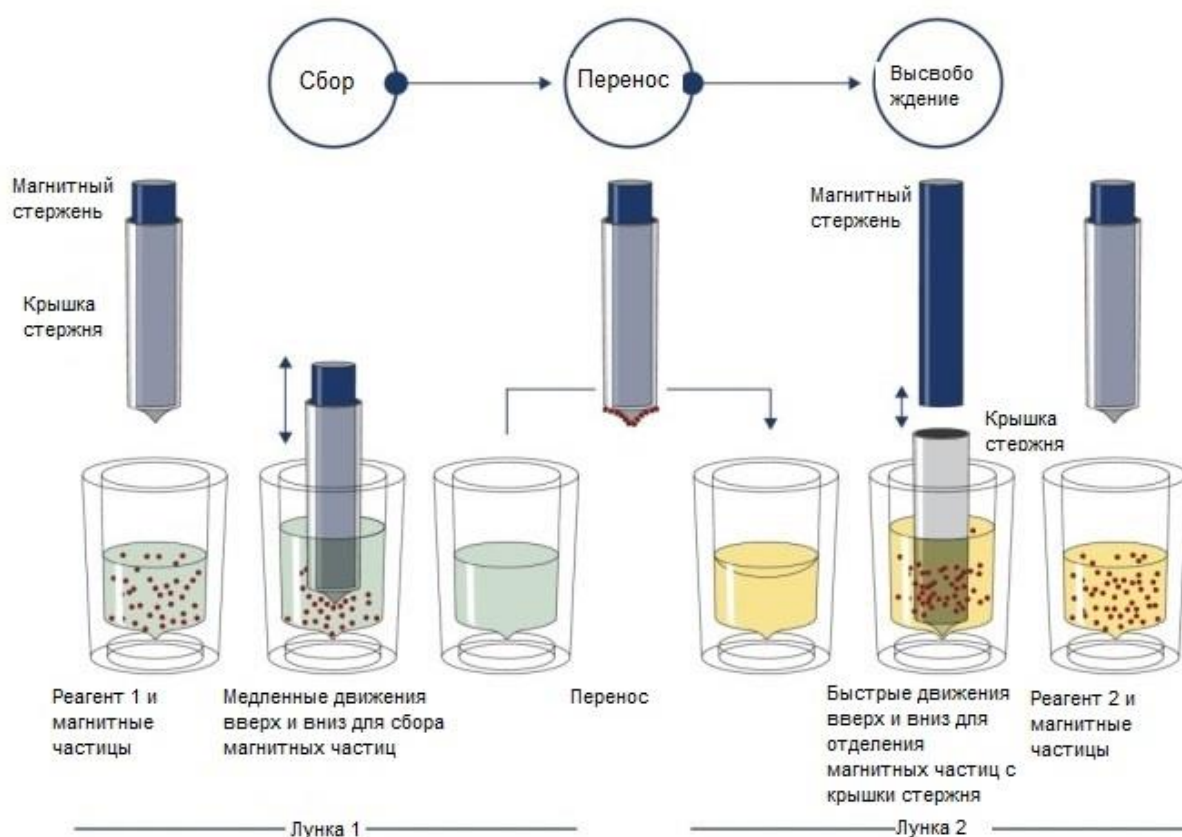


Рисунок 1. Схема принципа QIAasymphony SP. QIAasymphony SP обрабатывает образец, содержащий магнитные частицы, следующим образом: магнитный стержень, защищенный покрытием для стержня, входит в лунку, содержащую образец, и притягивает магнитные частицы. Покрытие для стержня расположено над другой лункой, и магнитные частицы высвобождаются. QIAasymphony SP использует магнитную головку, содержащую 24 магнитных стержней, и поэтому может обрабатывать до 24 образцов одновременно. Шаги 1 и 2 повторяются несколько раз во время обработки образца.

Процедура



Предоставляемые материалы

Состав набора

Набор QIAasympphony DSP Circulating DNA Kit		
Каталожный номер		937556
Количество реакций		192
RC	Картридж с реагентами	2
PROTK	QIAGEN Протеиназа К	6 x 10 мл
PL	Крышка для штатива	2
RSS	Набор полосок для повторного использования	2
	Руководство пользователя	1

Необходимые материалы, не входящие в состав набора

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта.

Убедитесь, что прибор поверен и откалиброван в соответствии с рекомендациями производителя.

- QIASymphony SP (кат.№ 9001297)
- Картридж для подготовки образцов, 8-луночный (кат.№ 997002)
- 8 крышек стержня (кат.№ 997004)
- Наконечники с фильтрами, 200 мкл 1 500 мкл (кат.№990332 и 997024)
- Пробирки. Совместимые форматы пробирок см. в списке лабораторного оборудования, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com.
- Пробирки или планшеты для элюции. Совместимые форматы пробирок и планшетов см. в списке лабораторного оборудования, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com.
- Фосфатно-солевой буфер (PBS, может потребоваться для доведения пробы до нужного объема)
- Вортекс
- Буфер ATL (для предварительной обработки мочи; кат.№ 939016)
- Дополнительные материалы, необходимые для предварительной обработки и стабилизации образцов мочи, см. в листе протокола, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на www.qiagen.com.

Меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*.

Перед использованием набора обязательно прочтите инструкции по технике безопасности.

При работе с химикатами всегда надевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации, пожалуйста, ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности материалов (MSDS). Они доступны онлайн в формате PDF по адресу www.qiagen.com/safety, где вы можете найти, просмотреть и распечатать MSDS для каждого набора QIAGEN и отдельных компонентов.

Не добавляйте отбеливатели или кислотные растворы непосредственно в отходы пробоподготовки.

Буферы в картридже с реагентами (RC) содержат азид натрия. Если буферы пролиты, очистите их подходящим лабораторным моющим средством и водой. Если разлитая жидкость содержит потенциально инфекционные агенты, очистите пораженный участок сначала лабораторным моющим средством и водой, а затем 1% гипохлоритом натрия.

Следующие заявления об опасности и мерах предосторожности относятся к компонентам набора QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit.

MBS3

Содержит азид натрия. Предупреждение! Может быть вреден при попадании внутрь. Позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или обратитесь к врачу, если вы плохо себя чувствуете.

Протеиназа К



Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. При вдыхании может вызывать симптомы аллергии, астмы или затруднение дыхания. Избегайте вдыхания пыли / дыма / газа / тумана / паров / брызг. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При появлении респираторных симптомов: обратиться в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу. ПРИ ВДЫХАНИИ: Если дыхание затруднено, выведите пострадавшего на свежий воздух и держите в покое в удобном для дыхания положении. Носите респиратор.

QSE2



Опасно! Вызывает серьезные ожоги кожи и повреждения глаз. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. При попадании в глаза: тщательно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть и это легко сделать. Продолжайте промывать. ПРИ ПОПАДАНИИ НА КОЖУ (или на волосы): Немедленно снять всю загрязненную одежду. Промыть кожу водой. Немедленно позвоните в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или врачу. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

QSW9



Содержит: этанол. Опасность! Вызывает серьезное раздражение глаз. Легковоспламеняющаяся жидкость и пар. Утилизировать содержимое / контейнер на утвержденном заводе по утилизации отходов. Если раздражение глаз не проходит, обратитесь к врачу. Хранить вдали от источников тепла / искр / открытого огня / горячих поверхностей. Не курить. Хранить в хорошо проветриваемом месте. Носить защитные перчатки / защитную одежду / средства защиты глаз / лица.

Условия транспортировки и хранения реагентов

Набор QIAasympphony DSP Circulating DNA Kit следует хранить в вертикальном положении при комнатной температуре (15–25°C). Не храните картриджи с реагентами (RC) при температуре ниже 15°C.

Примечание. На этикетке на коробке отображается срок годности набора. Файл результатов документирует даты истечения срока годности только для картриджа с реагентами (RC).

Не использовать QIAasympphony DSP Circulating DNA Kit по истечению срока годности.

Компоненты набора

Набор QIAasympphony DSP Circulating DNA Kit содержит готовую к употреблению протеиназу К, которая хранится при комнатной температуре.

Не храните картриджи с реагентами (RC) при температуре ниже 15°C.

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить не более 2 недель, что обеспечивает экономичное повторное использование реагентов и более гибкую обработку образцов. Если картридж с реагентами (RC) используется частично, замените крышку емкости, содержащей магнитные частицы, и запечатайте картридж с реагентами (RC) прилагаемыми полосками для повторного использования сразу после окончания цикла, чтобы избежать испарения.

Чтобы избежать испарения реагента, картридж с реагентом (RC) может быть открыт не более 15 часов (включая время работы) при максимальной температуре окружающей среды 30°C.

Запуск партий с низким количеством образцов (<24) увеличит как время, в течение которого картридж с реагентами (RC) открыт, так и требуемые объемы буфера, потенциально уменьшая общее количество проб на картридж.

Избегайте воздействия на картриджи с реагентами (RC) ультрафиолетового излучения (например, используемого для дезактивации), так как воздействие может вызвать ускоренное старение картриджей с реагентами (RC) и буферов.

Сбор и подготовка биологического образца

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре (включая информацию о пробирках для проб, которые можно использовать с определенными протоколами) и о конкретной предварительной обработке проб см. Соответствующий лист протокола, который можно найти на вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com.

Процедура

Автоматическая очистка на QIASymphony SP

QIASymphony SP делает автоматизированную пробоподготовку легкой и удобной. Образцы, реагенты и расходные материалы, а также элюаты разделяются в разных отсеках. Просто загрузите образцы, реагенты, поставляемые в специальных картриджах, и предварительно уложенные расходные материалы в соответствующий отсек перед выполнением. Запустите протокол и удалите очищенную ДНК из отсека для элюции после обработки. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.

Примечание. Дополнительное обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется для снижения риска контаминации.

Диапазон доступных протоколов постоянно расширяется, протоколы QIAGEN можно бесплатно загрузить с www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Загрузка картриджей с реагентами (RC) в отсек «Реагенты и расходные материалы»

Реагенты для очистки ДНК содержатся в картридже для реактивов (RC) (рис. 2). Каждая лунка картриджа с реагентами (RC) содержит определенный реагент, такой как магнитные частицы, связывающий буфер, промывочный буфер или элюирующий буфер. Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно использовать повторно, что позволяет избежать образования отходов из-за остатков реагентов в конце процедуры очистки.



Рисунок 2. QIAasympphony картридж с реагентами (RC). Картридж с реагентами (RC) содержит все реагенты, необходимые для выполнения протокола.

Перед началом процедуры убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Снимите лоток с магнитными частицами с рамки картриджа с реагентами, энергично встряхните его в течение не менее 3 минут, затем поместите его обратно перед первым использованием.

Примечание: магнитные частицы могут изменить цвет, что не влияет на производительность.

Поместите картридж с реагентами (RC) в держатель картриджа с реагентами. Перед первым использованием картриджа с реагентами (RC) установите крышку (PL) поверх картриджа с реагентами (RC).

Примечание: крышка (PL) острая. Будьте осторожны при установке его на картридж с реагентами (RC). Убедитесь, что крышка (PL) установлена на картридж с реагентами (RC) в правильной ориентации.

После того как крышка лотка с магнитными частицами снята, картридж с реагентами (RC) затем загружается в отсек «Реагенты и расходные материалы».

Частично использованные картриджи с реагентами (RC) можно хранить, см. «Хранение и обращение с реагентами».

Примечание. Протеиназу К следует добавлять в соответствии с протоколом во вкладке ресурсов на странице продукта на сайте www.qiagen.com.

Примечание. Убедитесь, что картриджи с реагентами, лотки с магнитными частицами и флаконы с протеиназой К не перепутаны.

Загрузка пластика в отсек «Реагенты и расходные материалы»

Картриджи для подготовки образца, крышки стержней (обе предварительно установлены в коробках) и одноразовые наконечники с фильтрами (наконечники 200 мкл в синих штативах и 1500 мкл в черных штативах) загружаются в отсек для реагентов и расходных материалов.

Примечание: убедитесь, что крышки боксов сняты, прежде чем загружать их в ящик «Реагенты и расходные материалы».

Слоты для штативов с наконечниками на рабочем столе QIASymphony SP могут быть заполнены штативами любого типа. QIASymphony SP определит тип наконечников, загруженных во время сканирования инвентаря.

Примечание. Не перезаряжайте штативы с наконечниками, боксы для картриджей, покрытия для стержней перед началом следующего запуска протокола. QIASymphony SP может использовать частично заполненные единицы.

Загрузка отсека для отходов

Картриджи для подготовки образцов и крышки стержней, используемые во время пробега, складываются в отсек для отходов. Убедитесь, что ящик для отходов содержит достаточно места для отходов, образующихся во время выполнения протокола.

Примечание: убедитесь, что крышки боксов для отходов сняты перед загрузкой боксов в отсек для отходов.

Пакет для сброса наконечников должен быть прикреплен к передней части отсека для отходов.

Примечание. Наличие пакета для сброса наконечников не проверяется системой. Перед началом выполнения протокола убедитесь, что пакет правильно прикреплен. Очистите пакет после обработки максимум 96 образцов, чтобы избежать застревания наконечников.

Контейнер для отходов собирает жидкие отходы, образующиеся в процессе очистки. Отсек для отходов можно закрыть, только если контейнер для отходов находится на месте. Утилизируйте жидкие отходы в соответствии с местными правилами безопасности и охраны окружающей среды. Не автоклавируйте

заполненную бутылку для отходов. Опорожните емкость для отходов после того, как будет обработано не более 96 образцов.

Загрузка отсека для элюции

Загрузите требуемый штатив в отсек для элюции. Поскольку длительное хранение элюатов в отсеке может привести к испарению элюатов, мы настоятельно рекомендуем использовать адаптеры охлаждения.

Сканирование

Перед началом цикла прибор проверяет, что в соответствующие отсеки загружено достаточное количество расходных материалов для поставленной в очередь партии.

Подготовка образцов биоматериала

Наборы QIAasymphony DSP Circulating DNA Kits предназначены для автоматической очистки свободноциркулирующей бесклеточной ДНК из плазмы и мочи человека.

Не допускайте образования пены в образцах. Пена может привести к пипетированию неправильного объема образца. В зависимости от исходного материала может потребоваться предварительная обработка образца. Образцы должны быть доведены до комнатной температуры (15–25°C) перед началом цикла.

Для получения дополнительной информации об автоматизированной процедуре (включая информацию о пробирках для проб, которые можно использовать с определенными протоколами) и о конкретной предварительной обработке проб см. Соответствующий лист протокола, который можно найти на сайте www.qiagen.com.

Хранение ДНК

После пробоподготовки элюаты можно хранить при температуре 2–8°C до 1 месяца. Для длительного хранения — при температуре -20°C или при -80°C. Замороженные элюаты нельзя размораживать более трех раз.

Обзор протокола

Таблица 1. Обзор протокола

Образец	Объем образца (мкл)	Объем элюции (мкл)	Протокол
Плазма, моча	2000	60	circDNA_2000_DSP
	4000	60	circDNA_4000_DSP

Важные заметки перед началом работы:

- Убедитесь, что вы знакомы с работой QIAasympphony SP. Обратитесь к руководствам пользователя, прилагаемым к вашему прибору, для получения инструкций по эксплуатации.
- Дополнительное техническое обслуживание не является обязательным для работы прибора, но настоятельно рекомендуется.
- Перед началом процедуры ознакомьтесь с разделом «Процедура», стр. 4.
- Убедитесь, что вы знакомы с листом протокола, соответствующим используемой процедуре (www.qiagen.com/goto/dspaxph). Также проверьте, требует ли протокол протеиназы K.
- Избегайте энергичного встряхивания картриджа с реагентами (RC), иначе может образоваться пена, что приведет к проблемам с обнаружением уровня жидкости.
- Перед началом предварительной обработки, для которой требуется буфер ATL, проверьте, не образовался ли осадок в буфере ATL. При необходимости растворите осадок нагреванием до 70°C при осторожном перемешивании на водяной бане. Аспирируйте пузырьки с поверхности буфера ATL.

До начала работы:

- Перед началом убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Встряхните емкость, содержащую магнитные частицы, в течение не менее 3 минут перед первым использованием.
- Убедитесь, что крышка (PL) установлена на картридже с реагентами (RC) и крышка лотка с магнитными частицами снята, или, если вы используете частично использованный картридж с реактивами (RC), убедитесь, что полоски для запечатывания были удалены.
- Протеиназа К не входит в картридж с реагентами, но должна быть предоставлена пользователем (отсек для проб, гнездо А, положение 1 и / или 2). Убедитесь, что доступен правильный объем протеиназы К. (Для получения подробной информации см. Лист протокола, который можно найти на www.qiagen.com).
- Если образцы помечены штрих-кодами, сориентируйте образцы в держателе для пробирок так, чтобы штрих-коды были обращены к считывателю штрих-кодов с левой стороны QIASymphony SP.
- Для получения информации о пробирках, совместимых с определенным протоколом, см. список лабораторного оборудования, который можно найти на www.qiagen.com.
- Информацию о минимальных объемах в пробирках для определенного протокола см. в соответствующем листе протокола (доступно по адресу www.qiagen.com/goto/dspaxph).

Протокол: Выделение свободноциркулирующей ДНК

Ниже приведен общий протокол использования наборов QIASymphony DSP. Подробная информация для каждого протокола, включая объемы образцов и пробирки, представлена в листах протоколов, которые можно найти на странице продукта на www.qiagen.com.

1. Закройте все отсеки и крышки.
2. Включите QIASymphony SP и дождитесь завершения инициализации процедуры.

Выключатель находится в левом нижнем углу QIASymphony SP.

3. Войдите в меню.
 4. Загрузите штатив для элюции в отсек для элюата.
Не загружайте 96-луночный планшет в «Слот для элюции 4». Необходимо использовать «Слот для элюции 1» с соответствующим адаптером охлаждения.
При использовании 96-луночного планшета убедитесь, что он находится в правильной ориентации, так как неправильное размещение может вызвать перепутывание образцов при последующем анализе.
 5. Убедитесь, что ящик для отходов подготовлен надлежащим образом, и выполните сканирование отсеков для отходов. При необходимости замените пакет для утилизации наконечников.
 6. Загрузите картридж с реагентами (RC) и расходные материалы в отсек «Реагенты и расходные материалы».
 7. Проведите сканирование отсека «Реагенты и расходные материалы».
 8. Поместите образцы в соответствующий держатель для образцов и загрузите их в отсек для образцов.
 9. Используя сенсорный экран, введите необходимую информацию для каждой партии образцов, подлежащих обработке.
 - Введите следующую информацию:
 - Информация об образце
 - Требуемый протокол
 - Выходное положение (используйте только «слот элюции 1»)
 - Пробирки с протеиназой K
- После того, как информация о партии была введена, статус изменяется с «ЗАГРУЗЕНО» на «В ОЧЕРЕДИ». Как только одна партия ставится в очередь, появляется кнопка «Выполнить».
10. Поместите протеиназу K в соответствующий носитель в позиции 1 и 2 и загрузите их в паз A отсека для образцов.
 11. Определите протеиназу K, нажав кнопку IC.
 12. Нажмите кнопку «Выполнить», чтобы начать процедуру очистки.

Все этапы обработки полностью автоматизированы. В конце запуска протокола состояние изменяется с «В РАБОТЕ» на «ЗАВЕРШЕНО».

13. Извлеките штатив для элюции, содержащую очищенную ДНК, из отсека для элюции.

14. ДНК готова к использованию или может храниться при температуре 2–8°C, –20°C, или –80°C.

Штатив для элюции следует вынуть из отсека для сразу после окончания пробега. В зависимости от температуры и влажности на элюирующих пластинах, оставленных в QIAasympyphony SP после завершения пробега, может происходить конденсация или испарение.

Как правило, магнитные частицы не переносятся в элюаты. Если происходит перенос, магнитные частицы в элюатах не будут влиять на большинство последующих применений. Если необходимо удалить магнитные частицы перед выполнением последующих операций, пробирки или планшеты, содержащие элюаты, следует сначала поместить в подходящий магнит, а элюаты перенести в чистую пробирку (см. Приложение).

Файлы результатов создаются для каждого планшета.

15. Если картридж с реагентами (RC) используется только частично, закройте его прилагаемыми полосками для запечатывания для повторного использования.

16. Утилизируйте использованные пробирки, планшеты и отходы в соответствии с местными правилами техники безопасности.

17. Очистите QIAasympyphony SP.

Следуйте инструкциям по обслуживанию в руководствах пользователя, прилагаемых к вашему прибору. Обязательно регулярно чистите прибор, чтобы минимизировать риск перекрестного загрязнения.

18. Закройте отсеки и выключите QIAasympyphony SP.

Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия набора QIAsymphony DSP Circulating DNA Kit проверяется на соответствие заранее установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

Ограничения

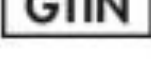
Эффективность системы была установлена в исследованиях по оценке эффективности очистки свободноциркулирующей бесклеточной ДНК человека из плазмы и мочи.

Пользователь несет ответственность за проверку работоспособности системы для любых процедур, используемых в его лаборатории, которые не охватываются исследованиями по оценке эффективности QIAGEN.

Любые результаты диагностики должны интерпретироваться в сочетании с другими клиническими или лабораторными данными.

Символы

Символы в следующей таблице включают символы, используемые в этих инструкциях по применению.

	Содержит реагенты для выделения N образцов ДНК
	Использовать до
	Для <i>in vitro</i> диагностики
	Каталожный номер
	Номер лота
	Номер материала
	Компоненты
	Содержит
	Количество
	Торговый номер

Rn

Версия и номер инструкции



Температурные границы



Производитель



Смотри инструкцию по применению



Внимание

PROTK

Протеиназа К

WELL

Номер ячейки

REAG CART

Картридж с реагентами

Sodium azide

Азид натрия

Руководство по устранению неполадок

Это руководство по устранению неполадок может помочь в решении любых проблем, которые могут возникнуть. Для получения дополнительной информации см. также страницу часто задаваемых вопросов в нашем Центре технической поддержки: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Ученые Технической службы QIAGEN всегда рады ответить на любые ваши вопросы, касающиеся информации или протоколов, приведенных в данном руководстве, или технологий проб и анализа (www.qiagen.com).

Комментарии и предложения	
Общее	
Сообщение об ошибке на экране	При возникновении сообщений об ошибке на экране обратитесь к руководству пользователя вашего прибора.
Преципитация реагентов в открытом картридже	
А) Испарение буфера	Чрезмерное испарение может привести к увеличению концентрации соли в буферах. Выбросьте картридж с реагентами (RC). Обязательно запечатайте буферные желоба частично использованного картриджа с реагентами (RC) с помощью полосок для повторного использования.
Б) Хранение картриджа с реагентами (RC)	Хранение картриджа с реагентами (RC) при температуре ниже 15 ° C может привести к образованию осадков.
Низкий выход нуклеиновых кислот	
А) Магнитные частицы не были полностью ресуспендированы	Перед началом процедуры убедитесь, что магнитные частицы полностью ресуспендированы. Интенсивно встряхивайте не менее 3 минут перед использованием.

	Комментарии и предложения
Б) Засорение наконечника нерастворёнными частицами	<p>Нерастворимый материал не удаляли из образца до начала процедуры очистки QIAAsymphony.</p> <p>При необходимости используйте процедуры предварительной обработки, как описано в соответствующем листе протокола, который можно найти на вкладке ресурса на странице продукта на www.qiagen.com.</p>
В) Исходный материал содержит малое количество свободноциркулирующей ДНК	<p>Из-за очень низких количеств циркулирующей бесклеточной ДНК в материале образца можно не определять концентрацию ДНК в зависимости от используемого метода количественного определения.</p> <p>Для определения количества используйте количественную ПЦР.</p>
Г) Неполное повторное использование картриджа с реагентом	<p>Обмен с окружающим воздухом может привести к снижению стабильности буферов, что приведет к снижению эффективности выделения ccfDNA с помощью частично использованного картриджа с реагентами (RC). Обязательно тщательно запечатывайте желоба частично использованного картриджа с реагентами с помощью полосок для повторного использования, когда они не используются для очистки.</p>
Д) Быстрая деградация циркулирующей бесклеточной ДНК в нестабилизированном образце мочи	<p>Вследствие быстрой деградации бесклеточной циркулирующей ДНК в нестабилизированных образцах мочи после сбора образцов можно обнаружить отсутствие / низкую концентрацию ДНК в элюатах. Рекомендуется стабилизировать образец мочи, как описано в соответствующем протоколе.</p> <p>В качестве альтернативы, образцы мочи сразу после сбора и центрифугирования подвергают предварительной обработке ATL и последующей экстракции ДНК на приборе, как описано в соответствующем протоколе.</p>
Неполный перенос образца	
А) Загружен неверный объем образца	<p>Если загружено менее 2,4 мл объема образца и 4,5 мл объема образца, соответственно, возрастает риск нечеткой пометки пробы или отсутствия переноса пробы (недопустимая пометка).</p> <p>Загрузите правильный объем образца, как описано в соответствующем списке лабораторного оборудования. Если недостаточно образца, добавьте PBS к образцу до необходимого объема образца перед загрузкой образца.</p>

	Комментарии и предложения
Б) Пузырьки или пена в пробирке с образцом	Пузырьки или пена в пробе и / или пробирке для ввода пробы могут привести к ложному определению уровня жидкости и последующему неполному переносу пробы. Удалить пузырьки из пробирки.
Видимые пузырьки в наконечниках в процессе работы	
Использование лабораторного оборудования FIX в сочетании с уменьшенным объемом ввода пробы	<p>Если с использованием лабораторного оборудования FIX загружено менее 2,1 мл объема образца и 4,1 мл объема соответственно, существует повышенный риск уменьшения переноса объема образца, который не обнаружен прибором. Это может привести к образованию пузырьков во время переноса образца и / или последующего этапа связывания.</p> <p>Загрузите правильный объем образца, как описано в соответствующем списке лабораторного программного обеспечения при использовании лабораторного программного обеспечения FIX. Если недостаточно образца, добавьте PBS к образцу до необходимого объема образца перед загрузкой образца.</p>

Приложение: Количественное определение неклеточной свободноциркулирующей ДНК

Из-за очень низких концентраций свободноциркулирующей бесклеточной ДНК в биологическом материале, измерение ДНК с помощью спектрофотометра не рекомендуется. Для определения концентрации свободноциркулирующей бесклеточной ДНК следует использовать чувствительный и точный количественный анализ на основе флуоресценции или анализ ПЦР в реальном времени.

Если необходимо удалить магнитные частицы, поместите пробирку, содержащую ДНК, в подходящий магнитный сепаратор (например, QIAGEN 12-Tube Magnet, кат.№ 36912), пока магнитные частицы не будут отделены.

Если ДНК находится в микропланшетах, наносите микропланшет на подходящий магнитный сепаратор (например, QIAGEN 96-луночный магнит типа A, № по каталогу 36915) до отделения магнитных частиц. Если подходящий магнитный сепаратор недоступен, центрифугируйте пробирку с ДНК в течение 1 минуты на полной скорости в микроцентрифуге для осаждения любых оставшихся магнитных частиц.

Информация для заказа

Продукт	Описание	Cat.no
QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (192)	Для 192 образцов ДНК: 2 картриджа с реагентами, протеиназу К и аксессуары	937556
QIAasymphony SP		
QIAasymphony SP	Автоматический экстрактор QIAasymphony SP, гарантия 1 год	9001297
Связанные продукты		
Buffer ATL (4 x 50 ml)	4 x 50 мл буфера ATL для предварительной обработки образцов мочи	939016
Proteinase K (10 ml)	10 мл протеиназы К	1105392
Reagent Cartridge Holder (2)	Держатель картриджа для реагентов для использования на QIAasymphony SP	997008
Cooling Adapter, 2 ml, v2, Qsym	Адаптер охлаждения для пробирок с закручивающейся крышкой 2 мл. Для использования в отсеке элюирования	9020674
Cooling Adapter, EMT, v2, Qsym	Адаптер охлаждения для EMT. Для использования в отсеке элюирования	9020730
Cooling Adapter, Snap-Cap Microtube QIAasymphony, Qsym	Адаптер охлаждения для 1,5 мл. Для использования в отсеке элюирования	9020731
Sample Prep Cartridges, 8-well (336)	Картриджи для использования на QIAasymphony SP	997002
8-Rod Covers (144)	Покрывала для стержней для использования на QIAasymphony SP	997004
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Штативы с наконечниками 200 мкл (8 x 128) для использования на QIAcube и QIAasymphony SP	990332

Продукт	Описание	Cat.no
Filter-Tips, 1500 µl (1024)	Штативы с наконечниками 1 500 мкл (8 x 128) для использования на QIAcube и QIAasympphony SP	997024
Tip Disposal Bags (15)	Пакеты для сброса наконечников для использования на QIAasympphony SP	9013395
12-Tube Magnet	Магнит для разделения магнитных частиц в пробирках 12 x 1,5 мл или 2 мл	36912
96-Well Magnet Type A	Магнит для разделения магнитных частиц планшетах, 2 x 96-луночных микропланшетов FB	36915
Reuse Seal Set (20)	Наборы уплотнителей для повторного использования частично использованных картриджей с реагентами QIAasympphony	997006
Elution Microtubes CL (24 x 96)	Нестерильные полипропиленовые пробирки (максимальная емкость 0,85 мл, емкость хранения менее 0,7 мл, емкость элюции 0,4 мл); 2304 в штативах по 96; включает крышки	19588

Справочники и руководства пользователя по наборам QIAGEN доступны на сайте www.qiagen.com или могут быть запрошены у технической службы QIAGEN или у местного дистрибьютора.

Заказ www.qiagen.com/shop

Техническая поддержка support.qiagen.com

Веб-сайт www.qiagen.com