

# Návod k použití sady QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA Blood Mini Kit (příručka)



Verze 3



Pro diagnostické použití in vitro

Pro použití se soupravou QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO



1127543CS

# Obsah

Účel použití.....	4
Určený uživatel.....	4
Popis a principy .....	5
Lýza krevních buněk .....	5
Vázání genomové DNA k membráně kolonky QIAamp Mini Spin .....	5
Odstranění reziduálních kontaminantů.....	6
Eluce čisté genomové DNA.....	6
Výtěžek a kvalita genomové DNA.....	7
Automatizovaná purifikace na přístroji QIAcube Connect MDx .....	7
Shrnutí a vysvětlení.....	10
Dodávané materiály .....	11
Obsah soupravy .....	11
Součásti soupravy.....	12
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky .....	13
Další reagensie .....	13
Spotřební materiály .....	13
Vybavení .....	13
Pouze pro postup s podtlakem.....	13
Pouze pro automatizovaný postup .....	14
Varování a bezpečnostní opatření.....	15
Informace o bezpečnosti .....	15
Bezpečnostní opatření .....	16

Likvidace .....	17
Skladování reagensů a manipulace s nimi .....	18
Stabilita při používání .....	18
Odběr a skladování vzorků a manipulace s nimi .....	19
Důležité poznámky .....	21
Důležité body před zahájením protokolu .....	21
Příprava reagensů a pufrů .....	22
Manipulace s kolonkami QIAamp Mini Spin .....	23
Nastavení vakuového systému QIAvac 24 Plus .....	24
Postup .....	26
Protokol: Izolace a purifikace genomové DNA z krevních alikvotů pomocí mikrocentrifugy anebo automatizovaná purifikace na přístroji QIAcube Connect MDx .....	26
Protokol: Izolace a purifikace genomové DNA z krevních vzorků pomocí podtlakového systému .....	30
Kontrola kvality .....	34
Omezení .....	35
Charakteristika funkčních vlastností .....	36
Řešení potíží .....	37
Symby .....	40
Informace pro objednání .....	43
Historie revízi dokumentu .....	45

## Účel použití

Sada QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit je systém, který využívá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp) k izolaci a purifikaci genomové DNA z biologických vzorků.

Souprava QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit je určena pro diagnostické účely in vitro.

## Určený uživatel

Výrobek je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři školenými v technikách molekulární biologie.

# Popis a principy

Každý postup QIAamp DSP DNA Blood Mini zahrnuje 4 kroky:

- Lýza buněk v krevním vzorku
- Vázání genomové DNA v buněčném lyzátu k membráně kolonky QIAamp Mini Spin
- Promytí membrány
- Eluce genomové DNA z membrány

Tato příručka obsahuje protokoly pro 2 alternativní postupy QIAamp DSP DNA Blood Mini: postup centrifugace (odstředění), jenž vyžaduje centrifugu, případně může být automatizován na přístroji QIAcube® Connect MDx (obrázek 1) a postup s použitím podtlaku (vakua), jenž vyžaduje centrifugu a podtlakový systém (viz schéma na str. 9).

## Lýza krevních buněk

Vzorky jsou lyzovány za denaturačních podmínek při zvýšených teplotách. Lýza se provádí za přítomnosti proteázy QIAGEN® Protease (QP) a lyzačního pufru (AL).

## Vázání genomové DNA k membráně kolonky QIAamp Mini Spin

Pro optimalizaci vázání genomové DNA k membráně kolonky QIAamp Mini Spin se nejprve přidá k lyzátu ethanol. Poté se každý lyzát nanese na kolonku QIAamp Mini Spin a genomová DNA je adsorbována na silikagelovou membránu při průchodu lyzátu indukovaném podtlakem nebo odstředivou silou.

## Odstranění reziduálních kontaminantů

Zatímco genomová DNA zůstává vázána na membránu kolonky QIAamp Mini Spin, kontaminanty se účinně vymývají nejprve promývacím pufrem 1 (AW1) a poté promývacím pufrem 2 (AW2).

## Eluce čisté genomové DNA

Genomová DNA je eluována z membrány kolonky QIAamp Mini Spin pomocí 50–200 µl elučního pufru (AE). Eluovaná DNA je připravena k použití v různých následných analýzách, včetně řady následných analýz pro diagnostické účely in vitro. Eluční pufr (AE) je nutné před aplikací na kolonku vytemperovat na laboratorní teplotu (15–25 °C).

Vzhledem ke zbývajícimu elučnímu pufru zadržnému membránou spin kolonky po centrifugaci může být objem získaného eluátu nižší než objem elučního pufru (AE) naneseného na kolonku. Objem získaného eluátu závisí na povaze alikvotu. Eluovaná DNA se jímá do elučních zkumavek (ET) a lze ji skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu až 4 týdnů. Při dlouhodobém skladování doporučujeme skladování při teplotě –20 °C.

**Poznámka:** Stabilita eluátů závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byla vyhodnocena pro soupravu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit ve spojení s příklady následných aplikací. Uživatel je povinen prostudovat si návod k použití konkrétní následné aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo ověřit celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

## Výtěžek a kvalita genomové DNA

Výtěžek DNA závisí na alikvotu a kvalitě výchozího materiálu. Eluce v nižších objemech zvyšuje konečnou koncentraci DNA v eluátu, ale mírně snižuje celkový výtěžek DNA. Doporučujeme používat eluční objem vhodný pro zamýšlenou aplikaci v dalších krocích.

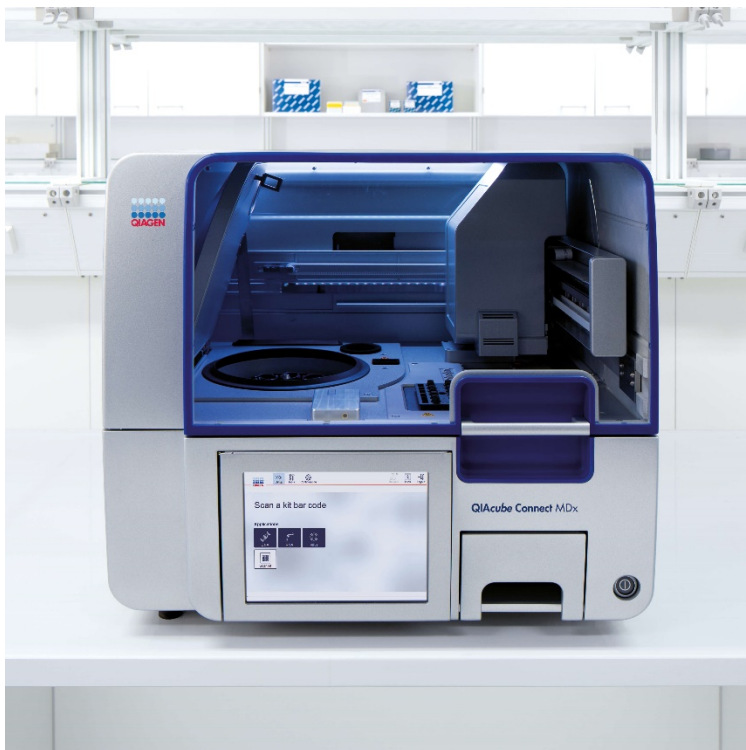
Výtěžkem a kvalitou je izolovaná genomová DNA vhodná pro následné detekční postupy v molekulární diagnostice, jako je PCR. Diagnostické analýzy musejí být prováděny podle pokynů výrobce.

## Automatizovaná purifikace na přístroji QIAcube Connect MDx

Přístroj QIAcube Connect MDx provádí automatizovanou izolaci a purifikaci nukleových kyselin. Přístroj může zpracovat až 12 alikvotů v jednom cyklu.

Příprava alikvotu pomocí přístroje QIAcube Connect MDx dodržuje stejný postup jako manuální proces (tj. lýza, vázání, promytí a eluce), což umožňuje použít soupravu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit k purifikaci vysoce kvalitní DNA.

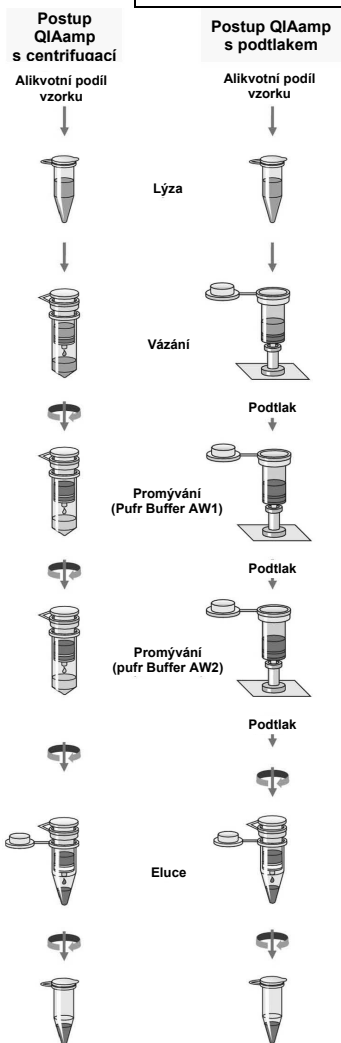
Při automatizovaném zpracování soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit na přístroji QIAcube Connect MDx může přístroj zpracovat méně než 50 alikvotů z důvodu mrtvých objemů, odpařování a další spotřeby reagentů automatizovaným pipetováním. Při manuálním použití soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit společnost QIAGEN garantuje pouze 50 stanovení alikvotů.



Obrázek 1. QIAcube Connect MDx.



## Postupy QIAamp DSP DNA Blood Mini s centrifugací a s podtlakem:



Před zahájením si pečlivě prostudujte protokoly (str. 26 a 30).

Do LT přidejte 20 µl QP, 200 µl alikvotu a 200 µl AL. Vortexujte po dobu 15 sekund. Inkubujte po dobu 10 minut při teplotě 56 °C. Přidejte 200 µl ethanolu. Vortexujte po dobu 15 sekund.

Přenešte lyzát na kolonku QIAamp Mini Spin. Postup s centrifugací (odstředěním): Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 6 000 × g.

Postup s podtlakem: Vytvořte podtlak.

Postup s centrifugací (odstředěním): Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do nové zkumavky WT, přidejte 500 µl AW1 a centrifugujte 1 minutu při otáčkách 6 000 × g.

Postup s podtlakem: Přidejte 750 µl AW1 a vytvořte podtlak.

Postup s centrifugací (odstředěním): Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do nové zkumavky WT, přidejte 500 µl AW2 a centrifugujte 1 minutu při plných otáčkách (přibližně 20 000 × g nebo 14 000 ot./min).

Postup s podtlakem: Přidejte 750 µl AW2 a vytvořte podtlak.

Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do zkumavky WT.

Centrifugujte 3 minuty při plných otáčkách (přibližně 20 000 × g nebo 14 000 ot./min).

Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do zkumavky ET.

Přidejte 50–200 µl AE a inkubujte po dobu 1 min.

Centrifugujte 1 minutu při otáčkách 6 000 × g.

## Shrnutí a vysvětlení

Sada QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit využívá zavedenou technologii k rychlé a jednoduché izolaci a purifikaci genomové DNA ze vzorku plné krve o objemu 200 µl.

Postup QIAamp DSP DNA Blood Mini, který je určen pro simultánní zpracování několika krevních alikvotů, umožňuje získat purifikovanou DNA připravenou k použití. Postupy jsou vhodné k použití s čerstvou nebo zmrazenou plnou krví a s krví ošetřenou citrátem nebo EDTA.

Předchozí separace leukocytů není nutná. Postup nevyžaduje fenol/chloroformovou extrakci ani precipitaci alkoholem. Postup vyžaduje pouze minimální interakci ze strany uživatele, tak umožňuje bezpečnou manipulaci s potenciálně infekčními vzorky. Postupy jsou navrženy tak, aby byla minimalizována zkřížená kontaminace vzorků. Purifikovanou DNA lze použít v PCR nebo v jiných aplikacích nebo může být skladována při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  po delší dobu.

Jednoduché postupy QIAamp DSP s centrifugací i podtlakem jsou vhodné pro simultánní zpracování několika alikvotů. Některé centrifugační postupy QIAamp lze plně automatizovat na přístroji QIAcube Connect MDx za účelem vyšší standardizace a snazšího použití (str. 7).

Pro postup s podtlakem je vyžadované vakuové potrubí (např. systém QIAvac 24 Plus s připojovacím systémem QIAvac Connecting System) a podtlaková pumpa schopná generovat podtlak přibližně 800–900 mbar (např. vakuová pumpa QIAGEN Vacuum Pump). Pro snadné sledování podtlaku a jeho pohodlné uvolnění by měl být použit vakuový regulátor Vacuum Regulator (součást připojovacího systému QIAvac Connecting System).

# Dodávané materiály

## Obsah soupravy




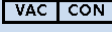
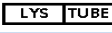
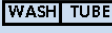

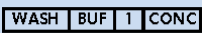

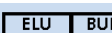
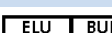


### QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Katalogové č.

61104

Počet stanovení

50

	Označení	Symbole	Množství
5	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (WT) (Kolonky QIAamp Mini Spin Column s promývacími zkumavkami) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Eluční zkumavky) (1,5 ml)	 	50
VC	VacConnectors		50
LT	Lysis Tubes (Lyzační zkumavky) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Promývací zkumavky) (2 ml)		3 × 50
AL	Lysis Buffer* (Lyzační pufr)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Promývací pufr 1) <sup>†</sup> (koncentrát)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Promývací pufr 2) <sup>‡</sup> (koncentrát)		13 ml
AE	Elution Buffer (Eluční pufr) <sup>‡</sup>		25 ml
PS	Protease Solvent <sup>‡</sup> (Rozpouštědlo proteázy)		2 ml
QP	QIAGEN Protease (Proteáza QIAGEN) <sup>§</sup>		1 lahvička
-	Návod k použití (příručka)		1

\* Při automatizovaném zpracování soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit na přístroji QIAcube Connect MDx může přístroj zpracovat méně než 50 alikvotů z důvodu mrtvých objemů, odpařování a další spotřeby reagensů automatizovaným pipetováním. Při manuálním použití soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit společnost QIAGEN garantuje pouze 50 stanovení alikvotů.

<sup>†</sup> Obsahuje guanidinyhydrochlorid. Není kompatibilní s dezinfekčními přípravky obsahujícími bělicí prostředky. Další informace naleznete v části Informace o bezpečnosti na straně 15.

<sup>‡</sup> Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

<sup>§</sup> Objem resuspenze 1,2 ml. Viz část „Příprava reagensů a pufrů“ na straně 22.

## Součásti soupravy

Hlavní součásti soupravy obsahující účinné složky jsou vysvětleny níže.

<b>Reagencie</b>	<b>Účinné přísady</b>	<b>Koncentrace (hm./hm.) [%]</b>
Proteáza QIAGEN Protease	Subtilisin	≥ 0 až ≤ 100
AL	Guanidinhydrochlorid Kyselina maleinová	≥ 30 až < 50 ≥ 0,1 až < 1
AW1	Guanidinhydrochlorid	≥ 50 až < 70

# Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

## Další reagensie

- Ethanol (96–100 %)\*

## Spotřební materiály

- Pipety† a pipetovací špičky (pro zamezení zkřížené kontaminace důrazně doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovými bariérami)
- Jednorázové rukavice

## Vybavení

- Topný blok† pro lýzu alikvotů při 56 °C (pro 1,5ml mikrozkušavky)
- Mikrocentrifuga†
- Odměrný válec (50 ml)
- Třepačka vortex

## Pouze pro postup s podtlakem

- Podtlakový systém QIAvac 24 Plus (kat. č. 19413), případně rovnocenný systém†
- Ventily VacValves (kat. č. 19408)
- Připojovací systém QIAvac Connecting System (kat. č. 19419)
- Podtlaková pumpa Vacuum Pump (kat. č. 84020)
- Regulátor podtlaku Vacuum Regulator (kat. č. 19530)

\* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například methanol nebo methylethylketon.

† Pro zajištění správného zpracování alikvotů při postupech QIAamp DSP DNA Blood Mini důrazně doporučujeme kontrolu a kalibraci nástrojů (např. pipet a topných bloků) podle doporučení výrobce.

## Pouze pro automatizovaný postup

- Příklad: Přístroj QIAcube Connect MDx (kat. č. 9003070)\*
- Adaptéry do rotoru Rotor Adapters (kat. č. 990394)
- Držák pro adaptéry do rotoru Rotor Adapter Holder (kat. č. 990392)
- Zkumavky na alikvoty Sample Tubes CB (kat. č. 990382; vstupní zkumavka na alikvoty)
- Zátky stojanu třepačky Shaker Rack Plugs (kat. č. 9017854)
- Reagenční lahvičky Reagent Bottles, 30 ml (kat. č. 990393)
- Špičky s filtrem Filter Tips, 1 000 µl (kat. č. 990352)
- Špičky s filtrem Filter Tips, 200 µl (kat. č. 990332)
- Zkumavka SafeSeal Tube, 1,5 ml (Sarstedt®; kat. č. 72.706)

\* Pro zajištění správného zpracování alikvotů při postupech QIAamp DSP DNA Blood Mini důrazně doporučujeme kontrolu a kalibraci nástrojů (např. pipet a topných bloků) podle doporučení výrobce.

# Varování a bezpečnostní opatření


Vezměte prosím na vědomí, že podle místních předpisů od vás může být vyžadováno nahlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti se zařízením, a to výrobci a/nebo jeho autorizovanému zástupci a regulačnímu orgánu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.

Pro diagnostické použití in vitro.

Před použitím sady si pečlivě přečtěte všechny pokyny.

## Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v pohodlném a kompaktním formátu PDF na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou sadu QIAGEN a pro každou součást těchto sad.

<p><b>UPOZORNĚNÍ</b></p> 	<p>NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělicích prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy alikvotů.</p>
--	--

- Lyzační pufr (AL) a promývací pufr 1 (AW1) obsahují guanidinhydrochlorid, který může v kombinaci s bělicími prostředky vytvářet vysoce reaktivní látky. V případě rozlití tekutin obsahujících tyto pufrы vyčistěte kontaminované místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Pokud rozlitá tekutina obsahuje potenciálně infekční látky, vyčistěte zasaženou oblast nejprve laboratorním detergentem a vodou a poté 1 % (obj.) roztokem chlornanu sodného. Jestliže jsou lahve s pufrém poškozeny nebo prosakují, použijte při likvidaci těchto lahví rukavice a ochranné brýle, abyste zabránili poškození vlastního zdraví nebo zdraví jiných osob.

- Společnost QIAGEN netestovala tekutý odpad vzniklý během postupů QIAamp DSP DNA Blood Mini na přítomnost reziduálních infekčních materiálů. Kontaminace tekutého odpadu reziduálními infekčními materiály je nepravděpodobná, nelze ji však zcela vyloučit. Tekutý odpad je proto nutné považovat za infekční a je nutné s ním zacházet a likvidovat jej v souladu s místními bezpečnostními předpisy.
- Vzorky a alikvoty jsou potenciálně infekční. Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

## Informace pro případ nouze

CHEMTREC

USA a Kanada 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

## Bezpečnostní opatření

Pro součásti soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit platí následující standardní věty o nebezpečnosti a pokyny pro bezpečné nakládání.

### Pufr Buffer AL



Obsahuje: guanidinhydrochlorid a kyselinu maleinovou. Varování! Může být škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře, pokud se necítíte dobře. V případě podráždění pokožky nebo vyrážky: Vyhledejte lékařskou pomoc. Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte. Obsah/nádobu likvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.

### Pufr Buffer AW1



Obsahuje: guanidinhydrochlorid. Varování! Škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Kontaminovaný oděv před opětovným použitím vyperte. Obsah/nádobu likvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu.



### Proteáza QIAGEN Protease



Obsahuje: subtilisin. Nebezpečí! Zdraví škodlivý při požití. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné poškození očí. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Může způsobit podráždění dýchacích cest. Nevdechujte prach/dým/plyn/mlhu/páry/aerosoly. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít. Používejte ochranný respirátor. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. POKUD dojde k zasažení nebo důvodné obavě, že došlo k zasažení: Ihned kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. Přeneste osobu na čerstvý vzduch a ponechte ji v poloze usnadňující dýchání.

## Likvidace

Odpad obsahuje alikvoty a reagenty. Tento odpad může obsahovat toxické nebo infekční materiály a musí být řádně zlikvidován. Postupujte při likvidačních procedurách v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online ve formátu PDF na stránkách [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), kde si uživatelé mohou vyhledat, zobrazit a vytisknout bezpečnostní listy pro každou soupravu QIAGEN a pro každou komponentu příslušné soupravy.

# Skladování reagensů a manipulace s nimi

Je třeba věnovat odpovídající pozornost datům expirace a podmínkám skladování vytištěným na obalu a štítcích všech součástí. Nepoužívejte součásti s prošlým datem expirace ani nesprávně skladované součásti.

Kolonky QIAamp Mini Spin by se měly po doručení uchovávat při teplotě 2–8 °C a lze je používat až do doby expirace uvedené na krabici soupravy.

**Poznámka:** Abyste zajistili, že nedojde ke smíchání součástí soupravy z různých souprav, označte kolonky QIAamp Mini Spin příslušným číslem šarže soupravy.

Všechny pufrы se mohou uchovávat při laboratorní teplotě (15–25 °C) až do doby expirace uvedené na krabici soupravy.

Lyofilizovanou proteázu QIAGEN Protease (QP) lze uchovávat při pokojové teplotě (15–25 °C) až do doby expirace na krabici sady, aniž by to negativně ovlivnilo její účinnost.

## Stabilita při používání

Rekonstituovaná proteáza QIAGEN Protease (QP) je stabilní až 1 rok, pokud se uchovává při teplotě 2–8 °C, ale pouze do doby expirace soupravy. Udržování zásobního roztoku proteázy QIAGEN Protease (QP) při laboratorní teplotě po dlouhou dobu není vhodné.

Rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) a rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) jsou stabilní po dobu 1 roku, pokud jsou uchovávány při laboratorní teplotě (15–25 °C), ale pouze do doby expirace soupravy.

Při přípravě pufrů pro automatizovaný postup postupujte podle pokynů uvedených v *uživatelské příručce k přístroji QIAcube Connect MDx* (najdete ji pod kartou zdrojů na produktové stránce na webové stránce [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Odběr a skladování vzorků a manipulace s nimi

**Poznámka:** Stabilita alikvotu vysoce závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byla posouzena na základě příkladů následných aplikací. Uživatel je povinen prostudovat si návod k použití konkrétní následné aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo ověřit celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

Obecná doporučení pro odběr, přepravu a skladování jsou uvedena ve schválené směrnici institutu CLSI MM13-A „Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods“ (Odběr, přeprava, příprava a skladování vzorků pro molekulární metody). Dále je třeba při přípravě, skladování, přepravě alikvotů a obecné manipulaci s nimi dodržovat pokyny výrobce vybraného zařízení pro odběr alikvotů. Nezávisle na pokynech výrobce zkumavky pro odběr krve by se pro extrakci genomové DNA z plné venózní krve měla brát v úvahu norma ISO 20186-2:2019 (E).

**Poznámka:** Podle normy ISO 20186-2:2019(E) může heparin ze zkumavek pro odběr krve ovlivnit čistotu izolovaných nukleových kyselin a případný přenos do eluátů by mohl způsobit inhibici v některých následných aplikacích. Proto doporučujeme používat krevní alikvoty ošetřené EDTA nebo citrátem jako antikoagulantem.

Pokud používáte čerstvé krevní alikvoty v primárních zkumavkách, před přenosem alikvotů je důkladně promíchejte (např. několikerým převrácením zkumavek). Zmrazené alikvoty (s maximálně 3 cykly zmrazení/rozmrazení) by před zahájením postupu měly být rychle rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C za mírného míchání, aby se zajistilo důkladné promíchání, a poté vytemperovány na laboratorní teplotu (15–25 °C). Zmrazené a rozmrazené krevní alikvoty nepoužívejte více než 3krát. K zajištění spolehlivého přenosu alikvotů je nutné zabránit vzniku pěny ve zkumavkách s alikvoty. Snažte se zabránit vzniku krevních sraženin v alikvotech a přeneste alikvot bez sraženin. Kryoprecipitáty vzniklé při rozmrazování zmrazených alikvotů ucpávají membránu kolonky QIAamp Mini Spin nebo mohou narušit automatizovaný postup na přístroji QIAcube Connect MDx. Pokud jsou patrné kryoprecipitáty, dbejte na to, aby nedošlo k jejich nasátí.

Výtěžek a kvalita purifikované DNA závisejí na podmínkách skladování krve. Čerstvější alikvoty krve mohou vést k lepším výsledkům. Pro krátkodobé skladování (do 10 dnů) doporučujeme skladovat při teplotě 2–8 °C. Pro aplikace vyžadující maximální velikost fragmentů, jako je Southernův přenos (Southern blotting), však doporučujeme skladování při teplotě 2–8 °C jen po dobu 3 dnů, protože po této době dojde k degradaci nízkých úrovní DNA. Pro dlouhodobé skladování (přes 10 dní) odeberte krev do zkumavek obsahujících standardní antikoagulant (přednostně EDTA, vyžaduje-li se vysokomolekulární DNA) a zkumavky skladujte při teplotě –20 nebo –80 °C.

# Důležité poznámky

## Důležité body před zahájením protokolu

- Po obdržení sady zkontrolujte, zda nejsou její komponenty poškozeny. V případě poškození blistrových obalů nebo láhví s puřrem kontaktujte oddělení technických služeb QIAGEN nebo místního distributora. V případě rozlití tekutiny postupujte podle pokynů uvedených v části „Informace o bezpečnosti“ (str. 15). Nepoužívejte poškozené součásti soupravy, protože použití takových součástí by mohlo negativně ovlivnit účinnost soupravy.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Pro minimalizaci zkřížené kontaminace doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Používejte vždy rukavice na jedno použití během celého procesu a pravidelně kontrolujte, zda nedošlo k jejich kontaminaci testovaným alikvotem. Pokud dojde ke kontaminaci rukavic, vyhodte rukavice do odpadu.
- Pro minimalizaci zkřížené kontaminace neotevírejte více zkumavek současně.
- Po všech krocích pulzního protřepávání ve vortexu mikrocentrifugační zkumavky krátce odstředte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víka. Uživatel by měl zajistit, aby byla během celého postupu zachována sledovatelnost alikvotů.
- Všechny kroky centrifugace se provádějí při laboratorní teplotě (15–25 °C).
- Při práci se soupravou nepoužívejte součásti jiných souprav, pokud nemají stejné číslo šarže.
- Zamezte mikrobiální kontaminaci reagentů sady.
- Pro zajištění ochrany před potenciálně infekčními materiály doporučujeme pracovat za podmínek laminárního proudění až do lýzy vzorků.
- Tuto sadu smí používat pouze personál školený v laboratorních metodách in vitro.

## Příprava reagensů a pufrů

- Příprava proteázy QIAGEN Protease

Do lahvičky s lyofilizovanou proteázou QIAGEN Protease (QP) přidejte 1,2 ml proteázového rozpouštědla (PS) a opatrně promíchejte. Aby obsah nepěnil, míchání proveďte několikanásobným obrácením lahvičky. Ujistěte se, že je proteáza QIAGEN Protease (QP) zcela rozpuštěná.

**Důležité:** Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).

- Příprava promývacího pufru 1

Pomocí odměrného válce přidejte 25 ml ethanolu (96–100%) do lahve obsahující 19 ml koncentráту promývacího pufru 1 (AW1). Rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) uchovávejte při laboratorní teplotě (15–25 °C).

**Důležité:** Před zahájením postupu vždy promíchejte rekonstituovaný promývací pufr 1 (AW1) několikanásobným převrácením lahve.

- Příprava promývacího pufru 2

Pomocí odměrného válce přidejte 30 ml ethanolu (96–100%) do lahve obsahující 13 ml koncentráту promývacího pufru 2 (AW2). Rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) uchovávejte při laboratorní teplotě (15–25 °C).

**Důležité:** Před zahájením postupu vždy promíchejte rekonstituovaný promývací pufr 2 (AW2) několikanásobným převrácením lahve.

- Příprava elučního pufru

Se sadou je dodávána jedna lahev elučního pufru (AE). Protože je nutné zamezit kontaminaci elučního pufru (AE), důrazně doporučujeme používat k pipetování elučního pufru (AE) z lahve pipetovací špičky s aerosolovou bariérou a okamžitě po odpipetování pufru vrátit zpět uzávěr na lahev.

**Důležité:** Eluční pufr (AE) obsahuje jako konzervační látku azid sodný, který vykazuje absorpenci při vlnové délce 260 nm. Při kvantifikaci DNA v eluátu měřením absorpance při 260 nm, při stanovení čistoty DNA v eluátu měřením absorpance při 260 nm a 280 nm anebo při skenování absorpance v rozmezí vlnových délek 220 nm až 350 nm proto vždy dbejte na to, aby slepé stanovení (blank) obsahovalo stejnou koncentraci azidu sodného jako eluát. Například při přípravě eluátu pro měření absorpance ředěním 50 µl eluátu ve 100 µl vody je nutné připravit slepé stanovení (blank) ředěním 50 µl elučního pufru (AE) ve 100 µl vody. Pro ředění používejte čerstvou destilovanou vodu.

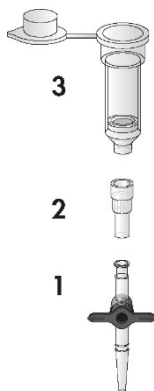
## Manipulace s kolonkami QIAamp Mini Spin

Vzhledem k senzitivě technik amplifikace nukleových kyselin je třeba při manipulaci s kolonkami QIAamp Mini Spin dodržovat následující preventivní opatření, aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci během příprav vzorků:

- Vzorek nebo roztok vkládejte do kolonky QIAamp Mini Spin opatrně. Napipetujte alikvot do kolonky QIAamp Mini Spin, aniž byste navlhčili její okraj.
- Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány kolonky QIAamp Mini Spin.
- Kolonky QIAamp Mini Spin otevřete jednu podruhé a dbejte na to, aby nevznikaly aerosoly.

## Nastavení vakuového systému QIAvac 24 Plus

Dbejte na správné nastavení kolonky QIAamp Mini Spin, přípojky podtlaku VacConnector (VC) a ventilu VacValve (viz obr. 2).



**Obrázek 2. Sestavení komponent sady QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit pro podtlakové zpracování alikvotů.**  
(1) Ventil VacValve (2) Přípojka VacConnector (VC) (3) Kolonka QIAamp Mini Spin.

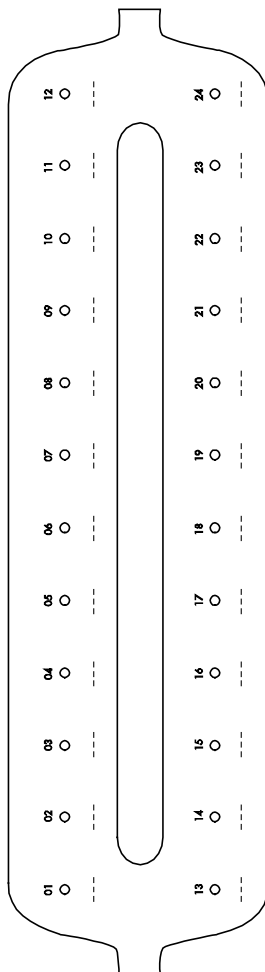
V případě použití postupu s podtlakem s využitím podtlakového systému QIAvac 24 Plus doporučujeme označit lyzační zkumavky (LT), eluční zkumavky (ET) a kolonky QIAamp Mini Spin podle schématu uvedeného na obrázku 3 (viz další stranu), aby se zamezilo záměně alikvotů. Je možné udělat fotokopii tohoto obrázku a označit na něm názvy alikvotů. Doporučujeme použít obdobné schéma i v případě použití jiných podtlakových systémů nebo centrifugačního postupu.



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

Uživatel: \_\_\_\_\_

ID cyklu: \_\_\_\_\_



**Obrázek 3. Schéma značení pro lyzační zkumavky (LT), eluční zkumavky (ET) a kolonky QIAamp Mini Spin pro použití s podtlakovým systémem QIAvac 24 Plus.**

# Postup

## Protokol: Izolace a purifikace genomové DNA z krevních alikvotů pomocí mikrocentrifugy anebo automatizovaná purifikace na přístroji QIAcube Connect MDx

Pro izolaci a purifikaci genomové DNA z alikvotů plné krve o objemu 200 µl, ošetřených EDTA nebo citrátem, pomocí mikrocentrifugy, případně automaticky na přístroji QIAcube Connect MDx.

### Důležité body před zahájením

- Níže uvedený postup obsahuje pokyny pro zpracování jednoho krevního alikvotu. Souběžně je však možné zpracovat několik alikvotů; jejich počet závisí na kapacitě použité mikrocentrifugy.
- Na přístroji QIAcube Connect MDx lze provádět automatizované zpracování 2–10 nebo 12 alikvotů.
- Při automatizaci postupujte podle pokynů uvedených v uživatelském rozhraní (přístroj QIAcube Connect MDx) a nahlédněte do *uživatelské příručky k přístroji QIAcube Connect MDx* (najdete ji pod kartou zdrojů na produktové stránce na webové stránce [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).





### Co je třeba udělat, než začnete






- Vytemperujte krevní vzorky na pokojovou teplotu a důkladně je promíchejte.
- Ujistěte se, že všechny reagenty a kolonky QIAamp Mini Spin (v uzavřených blistrech) jsou vytemperovány na laboratorní teplotu.
- Nastavte topný blok na teplotu 56 °C pro použití v kroku 4 (nutné pro manuální postup a automatizovaný postup s manuální lýzou mimo přístroj).

- Promývací pufrы 1 (AW1) a 2 (AW2) a proteáza QIAGEN Protease (QP) musejí být připraveny podle pokynů uvedených v části „Příprava reagensí a pufrů“ na straně 22.
- Pokud se v lyzačním pufru (AL) vytvořil precipitát, rozpusťte jej inkubací při teplotě 56 °C.
- Postupy kontroly kvality ve společnosti QIAGEN používají funkční testování soupravy před vydáním pro každou jednotlivou šarži soupravy. Nemíchejte proto reagensie z různých šarží sad ani nekombinujte jednotlivé reagensie z různých šarží reagensí.

## Postup

- U manuálního postupu s mikrocentrifugou postupujte podle kroků 1–15.
  - Tento postup lze automatizovat ve 3 různých verzích:
    - Eluční objem: 100 µl plně automatizované (automatizace od kroku 1)
    - Eluční objem: 200 µl plně automatizované (automatizace od kroku 1)
    - Manuální lýza: částečně automatizovaná s manuální lýzou mimo přístroj a elučními objemy 100–200 µl v krocích po 10 µl (automatizace začíná po kroku 5)
1. Do lyzační zkumavky (LT) napipetujte 20 µl proteázy QIAGEN Protease (QP).
    - ❗ Před použitím zkontrolujte datum expirace rekonstituované proteázy.
  2. Přidejte 200 µl krevního alikvotu do lyzační zkumavky (LT).
  3. Přidejte 200 µl lyzačního pufru (AL) do lyzační zkumavky (LT), uzavřete víčko a míchejte po dobu  $\geq 15$  sekund na pulzním vortexu.
    - ❗ Pro zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali alikvot a lyzační pufr (AL), čímž se získá homogenní roztok.
    - ❗ Vzhledem k vysoké viskozitě lyzačního pufru (AL) dbejte na přidání správného objemu lyzačního pufru (AL), a to pečlivým napipetováním a použitím vhodné pipety.
    - ❗ Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).
  4. Inkubujte při teplotě 56 °C po dobu 10 minut.

5. Centrifugujte lyzační zkumavku (LT) po dobu minimálně 5 sekund při maximální rychlosti, tímto krokem se odstraní kapky z vnitřní strany víčka.
  -  Byla-li manuální lýza (kroky 1–5) provedena mimo přístroj, lze následující kroky (kroky 6–15) automatizovat na přístroji QIAcube Connect MDx pomocí protokolu pro manuální lýzu.
6. Přidejte 200 µl ethanolu (96–100 %) do lyzační zkumavky (LT), uzavřete víčko a promíchejte důkladně po dobu  $\geq 15$  s na pulzním vortexu.
7. Centrifugujte lyzační zkumavku (LT) po dobu minimálně 5 sekund při maximální rychlosti, tímto krokem se odstraní kapky z vnitřní strany víčka.
8. Opatrně naneste celý lyzáát z kroku 7 na kolonku QIAamp Mini Spin, aniž byste navlhčili její okraj. Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány kolonky QIAamp Mini Spin.
  -  V případě souběžného zpracování několika alikvotů mějte vždy otevřenou pouze jednu lyzační zkumavku (LT).
9. Zavřete víčko kolonky QIAamp Mini Spin a centrifugujte při otáčkách přibližně  $6\,000 \times g$  po dobu 1 minuty. Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do čisté promývací zkumavky (WT) a vyhodte zkumavku obsahující filtrát do odpadu.
  -  Pokud veškerý lyzáát neprojde přes membránu po centrifugaci při  $6\,000 \times g$  ( $8\,000$  ot./min), centrifugujte znovu při plných otáčkách (přibližně  $20\,800 \times g$ ) po dobu 1 min.
  -  Pokud lyzáát během centrifugace neprojde zcela membránou, alikvot zlikvidujte a opakujte izolaci a purifikaci s novým materiálem alikvotu, a to počínaje krokem 1 na str. 27.
10. Opatrně otevřete kolonku QIAamp Mini Spin a přidejte 500 µl promývacího pufru 1 (AW1), aniž byste navlhčili její okraj. Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány kolonky QIAamp Mini Spin.
11. Zavřete víčko kolonky QIAamp Mini Spin a centrifugujte při otáčkách přibližně  $6\,000 \times g$  po dobu 1 minuty. Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do čisté promývací zkumavky (WT) a vyhodte zkumavku obsahující filtrát do odpadu.

12. Opatrně otevřete kolonku QIAamp Mini Spin a přidejte 500 µl promývacího pufru 2 (AW2), aniž byste navlhčili její okraj. Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány kolonky QIAamp Mini Spin.
13. Zavřete víčko kolonky QIAamp Mini Spin a centrifugujte při plných otáčkách (přibližně  $20\,000 \times g$ , tj. 14 000 ot./min.) po dobu 1 minuty. Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do čisté promývací zkumavky (WT) a vyhodte zkumavku obsahující filtrát do odpadu. Centrifugujte při plných otáčkách (přibližně  $20\,000 \times g$ , tj. 14 000 ot./min.) po dobu 3 minut; během centrifugace dojde k úplnému vysušení membrány.
-  Vynechání této centrifugace, při níž dochází k vysušení membrány, může vést k inhibici následné analýzy.
14. Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do čisté eluční zkumavky (ET) a vyhodte promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát do odpadu. Opatrně otevřete víčko kolonky QIAamp Mini Spin a naneste 50 až 200 µl elučního pufru (AE) na střed membrány.
-  Je důležité použít novou eluční zkumavku, aby nedošlo ke kontaminaci zbytky promývacích pufrů, což by mohlo vést k inhibici následné analýzy.
  -  Dávkování elučního pufru(AE) na střed membrány je důležité zejména u menších elučních objemů, aby se zajistilo optimální získání nukleových kyselin a elučního pufru (AE).
15. Zavřete víčko a inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty. Centrifugujte při otáčkách přibližně  $6\,000 \times g$  (8 000 ot./min.) po dobu 1 minuty; centrifugací dojde k eluci DNA.
-  Víčka elučních zkumavek orientujte tak, aby směřovala proti směru otáčení rotoru (např. pokud se rotor otáčí ve směru hodinových ručiček, orientujte víčka proti směru hodinových ručiček).
  -  V případě všech automatizovaných postupů odstraňte eluáty z přístroje ihned po dokončení cyklu a řádně je uložte.

## Protokol: Izolace a purifikace genomové DNA z krevních vzorků pomocí podtlakového systému

Pro izolaci a purifikaci genomové DNA ze vzorku plné krve o objemu 200 µl ošetřené EDTA nebo citrátem pomocí podtlakového systému, např. QIAvac 24 Plus.

### Důležitý bod před zahájením

Níže uvedený postup obsahuje pokyny pro zpracování jednoho krevního alikvotu. Pomocí podtlakového systému QIAvac 24 Plus je však možné zpracovat až 24 vzorků současně.

### Co je třeba udělat, než začnete

- Vytemperujte krevní vzorky na pokojovou teplotu a důkladně je promíchejte.
- Ujistěte se, že všechny reagentie a kolonky QIAamp Mini Spin (v uzavřených blistrech) jsou vytemperovány na laboratorní teplotu.
- Pro použití v kroku 4 nastavte topný blok na teplotu 56 °C.
- Promývací pufry 1 (AW1) a 2 (AW2) a proteáza QIAGEN Protease (QP) musejí být připraveny podle pokynů uvedených v části „Příprava reagentií a pufrů“ na straně 22.
- Pokud se v lyzačním pufru (AL) vytvořil precipitát, rozpustěte jej inkubací při teplotě 56 °C.
- Pro zamezení křížové kontaminace vložte přípojku podtlaku VacConnector (VC) do každého luer adaptéru podtlakového systému.
- Zkontrolujte, zda je nádoba na odpadní materiály podtlakového systému prázdná a zda jsou všechny spoje řádně propojeny.
- Podrobné informace o provozu vakuového systému, zejména informace o údržbě, jsou uvedeny v příručce přiložené k tomuto systému.
- Postupy kontroly kvality ve společnosti QIAGEN používají funkční testování soupravy před vydáním pro každou jednotlivou šarži soupravy. Nemíchejte proto reagentie z různých šarží sad ani nekombinujte jednotlivé reagentie z různých šarží reagentií.

## Postup

1. Do lyzační zkumavky (LT) napipetujte 20 µl proteázy QIAGEN Protease (QP).
  - ❗ Před použitím zkontrolujte datum expirace rekonstituované proteázy.
2. Přidejte 200 µl alikvotu krve do lyzační zkumavky (LT).
3. Přidejte 200 µl lyzačního pufru (AL) do lyzační zkumavky (LT), uzavřete víčko a míchejte po dobu  $\geq 15$  sekund na pulzním vortexu.
  - ❗ Pro zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali alikvot a lyzační pufr (AL), čímž se získá homogenní roztok.
  - ❗ Vzhledem k vysoké viskozitě lyzačního pufru (AL) dbejte na přidání správného objemu lyzačního pufru (AL), a to pečlivým napipetováním a použitím vhodné pipety.
  - ❗ Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufru (AL).
4. Inkubujte při teplotě 56 °C po dobu 10 minut.
5. Centrifugujte lyzační zkumavku (LT) po dobu  $\geq 5$  sekund při plných otáčkách; tímto krokem se odstraní kapky z vnitřní strany víčka.
6. Přidejte 200 µl ethanolu (96–100%) do lyzační zkumavky (LT), uzavřete víčko a promíchejte důkladně po dobu  $\geq 15$  s na pulzním vortexu.
7. Centrifugujte lyzační zkumavku (LT) po dobu  $\geq 5$  sekund při plných otáčkách; tímto krokem se odstraní kapky z vnitřní strany víčka.
8. Kolonku QIAamp Mini Spin vložte do přípojky podtlaku VacConnector (VC) podtlakového systému. Ujistěte se, že jsou hlavní ventil podtlaku (mezi podtlakovým systémem a vedením) a ventil se šroubovým uzávěrem (na podtlakovém vedení) uzavřené. Zapněte podtlakovou pumpu.

Promývací zkumavku (WT) (2 ml), ve které je umístěna kolonka QIAamp Mini Spin v blístru, vyhodte do odpadu.

Podtlak se aplikuje pouze u spojovacího systému (je-li použit), nikoli u podtlakového vedení.

9. Opatrně naneste celý lyzát z kroku 7 na kolonku QIAamp Mini Spin, aniž byste navlhčili její okraj. Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány kolonky QIAamp Mini Spin.



V případě souběžného zpracování několika alikvotů mějte vždy otevřenou pouze jednu lyzační zkumavku (LT).

10. Otevřete hlavní podtlakový ventil. Po průchodu lyzátu přes kolonku QIAamp Mini Spin zavřete hlavní podtlakový ventil a otevřete ventil se šroubovým uzávěrem na podtlakovém vedení, aby došlo k odvětrání vedení. Poté, co se podtlak z vedení uvolní, ventil se šroubovým uzávěrem zavřete.

Po uzavření hlavního podtlakového ventilu se podtlak aplikuje pouze u spojovacího systému (je-li použit), nikoli u podtlakového vedení.



Ventil se šroubovým uzávěrem podtlakového vedení použijte pro rychlé uvolnění podtlaku.



Při souběžném zpracování několika kolonek QIAamp Mini Spin doporučujeme po průchodu lyzátu uzavřít podtlakový ventil VacValve každé kolonky. Tímto postupem se sníží doba potřebná k uskutečnění tohoto kroku.








Pokud lyzát neprojde zcela membránou do 10 minut, vložte kolonku QIAamp Mini Spin do čisté promývací zkumavky (WT), uzavřete víčko a centrifugujte při otáčkách  $6\ 000 \times g$  ( $8\ 000$  ot./min.) po dobu 3 minut nebo až do úplného průchodu lyzátu. Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do další čisté promývací zkumavky (WT) a pokračujte krokem 10 protokolu na str. 32.



Pokud lyzát během centrifugace neprojde zcela membránou, alikvot zlikvidujte a opakujte izolaci a purifikaci s novým materiálem alikvotu, a to počínaje krokem 1 na str. 31.

11. Na kolonku QIAamp Mini Spin naneste 750  $\mu$ l promývacího pufru 1 (AW1), aniž by došlo k navlhčení okraje kolonky. Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány kolonky QIAamp Mini Spin. Víčko kolonky nechejte otevřené a otevřete hlavní vakuový ventil. Po průchodu promývacího pufru 1 (AW1) přes kolonku QIAamp Mini Spin zavřete hlavní podtlakový ventil a otevřete ventil se šroubovým uzávěrem na podtlakovém vedení, aby došlo k odvětrání vedení. Poté, co se podtlak z vedení uvolní, ventil se šroubovým uzávěrem zavřete.



12. Na kolonku QIAamp Mini Spin naneste 750  $\mu$ l promývacího pufru 2 (AW2), aniž by došlo k navlhčení okraje kolonky. Nedotýkejte se pipetovací špičkou membrány kolonky QIAamp Mini Spin. Víčko kolonky nechejte otevřené a otevřete hlavní vakuový ventil. Po průchodu promývacího pufru 2 (AW2) přes kolonku QIAamp Mini Spin zavřete hlavní podtlakový ventil a otevřete ventil se šroubovým uzávěrem na podtlakovém vedení, aby došlo k odvětrání vedení. Poté, co se podtlak z vedení uvolní, ventil se šroubovým uzávěrem zavřete.
13. Zavřete víčko kolonky QIAamp Mini Spin, odpojte ji od podtlakového systému a vyhodte přípojku podtlaku VacConnector (VC) do odpadu. Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do čisté promývací zkumavky (WT) a centrifugujte při plných otáčkách (přibližně 20 000  $\times$  g, tj. 14 000 ot./min.) po dobu 3 minut; během centrifugace dojde k úplnému vysušení membrány.
-  Vynechání této centrifugace, při níž dochází k vysušení membrány, může vést k inhibici následné analýzy.
14. Vložte kolonku QIAamp Mini Spin do čisté eluční zkumavky (ET) a vyhodte promývací zkumavku (WT) obsahující filtrát do odpadu. Opatrně otevřete víčko kolonky QIAamp Mini Spin a naneste 50 až 200  $\mu$ l elučního pufru (AE) na střed membrány.
-  Je důležité použít novou eluční zkumavku (ET), aby nedošlo ke kontaminaci zbytky promývacích pufrů, což by mohlo vést k inhibici následné analýzy.
  -  Dávkování elučního pufru (AE) na střed membrány je důležité zejména u menších elučních objemů, aby se zajistilo optimální získání nukleových kyselin a elučního pufru (AE).
15. Zavřete víčko a inkubujte při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty. Centrifugujte při otáčkách 6 000  $\times$  g (8 000 ot./min.) po dobu 1 minuty; centrifugací dojde k eluci DNA.
-  Víčka elučních zkumavek (ET) orientujte tak, aby směřovala proti směru otáčení rotoru (např. pokud se rotor otáčí ve směru hodinových ručiček, orientujte víčka proti směru hodinových ručiček).
  -  Po provedení tohoto protokolu proveďte údržbu podtlakového systému (bližší informace k tomuto naleznete v příručce dodávané s podtlakovým systémem).

## Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení kvality společnosti QIAGEN, certifikovaným podle norem ISO, je každá šarže sady QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit podrobena testům předem definovaných parametrů, které zajišťují odpovídající kvalitu výrobků.

# Omezení

Účinnost systému byla stanovena použitím plné krve pro izolaci genomové DNA.

Informace o použití soupravy QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit naleznete v oddíle „Popis a principy“. Automatizovaný postup je podrobně popsán v oddíle „Protokol: Izolace a purifikace genomové DNA z krevních alikvotů pomocí mikrocentrifugy anebo automatizovaná purifikace na přístroji QIAcube Connect MDx“.

Každý uživatel je zodpovědný za validaci funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností výrobků QIAGEN.

Pro minimalizaci rizika negativního dopadu na diagnostické výsledky je zapotřebí používat pro následné aplikace odpovídající kontroly. Pro další validaci se doporučují pokyny Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků (International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH) uvedené v dokumentu ICH Q2(R1) „Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology“ (Validace analytických postupů: Text a metodologie).

Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musejí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů.

## Charakteristika funkčních vlastností

Platné charakteristiky funkčních vlastností jsou k dispozici pod kartou zdrojů na produktové stránce na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Řešení potíží

Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a/nebo protokolů v této příručce i obecně k technologiím pro přípravu alikvotů a jejich analýz (kontaktní údaje naleznete na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Komentáře a návrhy

### Obecné pokyny k manipulaci

- a) Ucpávání pipetovacích špiček při přenosu alikvoty
- Před přenosem alikvotů je důkladně promíchejte (např. několikrát převrácením zkumavek). Zmrazené alikvoty by před zahájením postupu měly být rychle rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C za mírného míchání, aby se zajistilo důkladné promíchání, a poté vytemperovány na laboratorní teplotu (15–25 °C).
- Snažte se zabránit vzniku krevních sraženin v alikvotech a přeneste alikvot bez sraženin. Kryoprecipitáty vzniklé při rozmrazování zmrazených alikvotů ucpávají membránu kolonky QIAamp Mini Spin nebo mohou způsobit problémy při automatizovaném postupu.
- b) Zanesená kolonka QIAamp Mini Spin
- Pracovní postup s centrifugací:**
- Pokud veškerý lyzát neprojde přes membránu po centrifugaci při 6 000 × g (8 000 ot./min), centrifugujte znovu při plných otáčkách (přibližně 20 800 × g) po dobu 1 min.
- Pokud lyzát během centrifugace neprojde zcela membránou, alikvot zlikvidujte a opakujte izolaci a purifikaci s novým materiálem alikvoty, a to počínaje krokem 1.
- Pracovní postup s podtlakem:**
- Pokud je průtok snížen, lze prodloužit dobu podtlaku.
- Případně zavřete ventil VacValve, pokud je použit, a opatrně z kolonky QIAamp Mini Spin vyjměte sestavu VacConnector–VacValve, aniž byste ztratili jakýkoli lyzát.
- Vyjměte kolonku QIAamp Mini Spin z vakuového potrubí, vložte ji do 2ml promývací zkumavky a odstředte ji při plných otáčkách, dokud alikvot zcela neprojde membránou. Vraťte zpět sestavu VacConnector–VacValve obsahující zbývající lyzát. Zapněte vakuovou pumpu, otevřete ventil VacValve a pokračujte ve vkládání zbývajících lyzátů.
- Pokud se kolonka QIAamp Mini Spin nadále ucpává, opakujte výše uvedený postup.
- Pokud lyzát během centrifugace neprojde zcela membránou, alikvot zlikvidujte a opakujte izolaci a purifikaci s novým materiálem alikvoty, a to počínaje krokem 1.

## Komentáře a návrhy

### Všeobecné informace

V důsledku opakovaného zmrazování a rozmrazování se mohly vytvořit kryoprecipitáty. Ty mohou kolonku QIAamp Mini Spin zablokovat. Zmrazené a rozmrazené krevní alikvoty nepoužívejte více než 3krát. Zmrazené alikvoty by před zahájením postupu měly být rychle rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C za mírného míchání, aby se zajistilo důkladné promíchání, a poté vytemperovány na laboratorní teplotu (15–25 °C).

- c) V lyzačním pufru (AL) se vytvořil precipitát Rozpusťte inkubací lyzačního pufru (AL) při teplotě 56 °C.
- d) Variabilní eluční objemy Objem získaného eluátu závisí na povaze alikvoty. Vzhledem ke zbývajícímu elučnímu pufru (AE) zadrženému membránou spin kolonky po centrifugaci může být objem získaného eluátu nižší než objem elučního pufru naneseného na kolonku. Do středu membrány naneste eluční pufr (AE). Dávkování elučního pufru (AE) na střed membrány je důležité zejména u menších elučních objemů, aby se zajistilo optimální získání nukleových kyselin a elučního pufru (AE).
- e) Podtlak přibližně 800–900 mbar nebyl dosažen. Vakuové potrubí není pevně uzavřeno. Po zapnutí vakua zatlačte víčko vakuového potrubí dolů. Zkontrolujte, zda je dosaženo podtlaku. Těsnění víka QIAvac je opotřebované. Pohledem zkontrolujte těsnění potrubí a v případě potřeby je vyměňte. Ventily VacValves jsou opotřebované. Vyměňte všechny ventily VacValves a vložte přípojky VacConnector (VC) přímo do rozšíření luer. Vložte kolonky QIAamp Mini Spin do přípojek VacConnector (VC), zavřete víčko kolonek a zapněte podtlak. Zkontrolujte, zda je dosaženo podtlaku. V případě potřeby ventily VacValves vyměňte. Připojení k vakuové pumpě je netěsné. Uzavřete všechna rozšíření luer krytkami luer a zapněte vakuovou pumpu. Zkontrolujte, zda je podtlak po zapnutí pumpy (a zavření ventilu Vacuum Regulator) stabilní. V případě potřeby vyměňte propojení mezi pumpou a vakuovým potrubím. Pokud podtlak stále není dosažen, vyměňte vakuovou pumpu za silnější.
- f) Problémy v automatizovaném pracovním postupu Prostudujte si *uživatelskou příručku k přístroji QIAcube Connect MDx* (kterou lze nalézt pod kartou zdrojů na produktové stránce na webové stránce [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Nízký výtěžek DNA

- a) Neúplná lýza alikvotů Pokud byla proteáza QIAGEN Protease (QP) dlouhodobě vystavena zvýšené teplotě, může ztratit svou aktivitu. Opakujte postup s použitím nových alikvotů a čerstvou proteázou QIAGEN Protease (QP). Ujistěte se, že jste proteázu QIAGEN Protease (QP) rozpustili s rozpouštědlem proteázy (PS) podle výše uvedených pokynů. Aby obsah nepřelil, míchání proveďte několikanásobným obrácením lahvičky. Ujistěte se, že je proteáza QIAGEN Protease (QP) zcela rozpuštěná. Nepřidávejte proteázu QIAGEN Protease (QP) přímo do lyzačního pufru (AL). Pro zajištění efektivní lýzy je zásadně důležité, abyste důkladně promíchali alikvot a lyzační pufr (AL), čímž se získá homogenní roztok. Vzhledem k vysoké viskozitě lyzačního pufru (AL) dbejte na přidání správného objemu lyzačního pufru (AL), a to pečlivým napipetováním a použitím vhodné pipety.

## Komentáře a návrhy












- |    |   |   |
|----|---|---|
| b) | Namísto 96–100% byl použit nízkoprocentní ethanol                 | Zopakujte purifikační proceduru s novými alikvoty a 96–100% ethanolem. Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například methanol nebo methylethylketon.  |
| c) | Pufír Buffer AW1 nebo pufír Buffer AW2 byl připraven nesprávně    | Před zahájením postupu se ujistěte, že koncentráty pufíru Buffer AW1 a pufíru Buffer AW2 byly zředěny správným objemem 96–100% ethanolu a několikerym převrácením lahvičky promíchány.  |
| d) | Krevní alikvoty nebyly správně skladovány                         | Výtěžek a kvalita purifikované DNA závisejí na podmínkách skladování krve. Čerstvější alikvoty krve mohou vést k lepším výsledkům. Pro krátkodobé skladování (do 10 dnů) doporučujeme skladovat při teplotě 2–8 °C. Pro aplikace vyžadující maximální velikost fragmentů, jako je Southernův přenos (Southern blotting), však doporučujeme skladování při teplotě 2–8 °C jen po dobu 3 dnů, protože po této době dojde k degradaci nízkých úrovní DNA. Pro dlouhodobé skladování (přes 10 dní) odeberte krev do zkumavek obsahujících standardní antiokoagulant (přednostně EDTA, vyžaduje-li se vysokomolekulární DNA) a zkumavky skladujte při teplotě –20 nebo –80 °C. |
| e) | Zmrazené krevní alikvoty nebyly po rozmrazení důkladně promíchány | Zmrazené alikvoty by před zahájením postupu měly být rychle rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 37 °C za mírného míchání, aby se zajistilo důkladné promíchání, a poté vytemperovány na laboratorní teplotu (15–25 °C).   |

## DNA nemá dobrou účinnost v následných reakcích












- |    |                                   |   |
|----|-----------------------------------|---|
| a) | V eluátu je málo DNA nebo žádná   | Možné příčiny jsou uvedeny výše v části „Nízký výtěžek DNA“. Pokud možno, zvyšte množství eluátu přidaného do reakce.   |
| b) | Použití nevhodný eluční objem     | Stanovte maximální objem eluátu vhodný pro vaši následnou aplikaci. V souladu s tím snižte nebo zvyšte objem eluátu přidaného do následné aplikace. Eluční objem může být úměrně upraven. Eluce s menším objemem pufíru Buffer AE vede k vyšším koncentracím nukleových kyselin, ale může vést k nižšímu celkovému výtěžku. |
| c) | Nedostatečné množství použité DNA | Změřte množství purifikované DNA spektrofotometrickým měřením absorbance při vlnové délce 260 nm.   |
| d) | Nadměrné množství použité DNA     | Nadbytečné množství DNA může inhibovat některé enzymatické reakce. Změřte množství purifikované DNA spektrofotometrickým měřením absorbance při vlnové délce 260 nm.  |
| e) | Potenciální přenos inhibitorů     | Před elucí nezapomeňte provést krok centrifugace za účelem vysušení, abyste zabránili možnému inhibici následné analýzy. Je důležité použít novou eluční zkumavku (ET), aby nedošlo ke kontaminaci zbytky promývacích pufíru, což by mohlo vést k inhibici následné analýzy.  |







# Symbols

V návodu k použití anebo na obalu a značení se objevují následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
	Obsahuje dostatek reagensů pro <N> reakcí
	Použijte do
	Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Při dodání
	Otevřít při převzetí; kolonky QIAamp Mini Spin uchovávejte při teplotě 2–8 °C
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (tj. označení dílu)
	Komponenty
	Obsahuje



Symbol	Definice symbolu
	Číslo
	Globální číslo obchodní položky
Rn	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Viz návod k použití
	Objem
	Zapište aktuální datum přidání ethanolu do lahve _____
	Přidání
	Lyofilizováno
	Rekonstituujte v
	Ethanol

Symbol	Definice symbolu
	Guanidinhydrochlorid
	Subtilisin
	Způsobuje
	Viz návod k použití
	Důležitá poznámka
	Jedinečný identifikátor prostředku

# Informace pro objednání

Výrobek	Obsah	Kat. č.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Pro přípravu 50 alikvotů: odstředivací kolonky QIAamp Mini Spin, pufrý, reagentie, zkumavky, přípojky VacConnectors	61104
<b>Související výrobky</b>		
Přístroj QIAcube Connect MDx*	Přístroj a roční záruka na díly a servis	9003070
<b>Příslušenství</b>		
QIAvac 24 Plus†	Podtlakové vedení pro zpracování 1– 24 spin kolonek: obsahuje podtlakové vedení QiAvac 24 Plus vacuum manifold, luerové konektory, rychlospojky	19413
Podtlaková pumpa Vacuum Pump (230 V, 50 Hz)†	Univerzální podtlaková pumpa (výkon 34 l/min, 8 mbar abs. podtlak)	84020
Přípojky VacConnector (500)†	500 jednorázových konektorů pro použití s kolonkami QIAamp Spin na luerových konektorech	19407
VacValves (24)	24 ventilů pro použití se systémy QIAvac 24 a QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Pro použití s vedením QIAvac	19530
QIAvac Connecting System	Systém pro připojení podtlakového vedení k podtlakové pumpě: zahrnuje nosič, lahve na odpad, hadičky, spojky, ventil, měřidlo, 24 ventilů VacValve	19419
Rotor Adapters (10 x 24)	Pro přípravu 240 alikvotů: 240 jednorázových adaptérů rotoru a 240 elučných zkumavek (1,5 ml) pro použití na přístroji QIAcube Connect MDx	990394

Výrobek	Obsah	Kat. č.
Rotor Adapter Holder	Držák na 12 jednorázových adaptérů rotoru; pro použití s přístrojem QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB (2 ml)	1 000 zkumavek se šroubovacím víčkem bez olemované základny (2 ml) pro použití na přístroji QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Zátky stojanu třepačky (12)	9017854
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Reagenční lahve Reagent Bottles (30 ml) s víčky; balíček po 6 kusech; pro použití s přístrojem QIAcube Connect MDx	990393
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Jednorázové špičky s filtrem, ve stojanech; (8 × 128) Pro použití na přístroji QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	Jednorázové špičky s filtrem, široký otvor, umístěné ve stojanech; (8 × 128); není vyžadováno pro všechny protokoly. Pro použití na přístroji QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Jednorázové špičky s filtrem, ve stojanech; (8 × 128) Pro použití na přístrojích QIAcube Connect MDx a QIASymphony SP/AS	990332

\* Přístroj QIAcube Connect MDx není k dispozici ve všech zemích. Pro další podrobnosti kontaktujte oddělení technických služeb společnosti QIAGEN.

† Pro použití s protokoly pro podtlak.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v návodu k použití příslušné soupravy QIAGEN. Návody k použití souprav QIAGEN jsou k dispozici na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nebo si je lze vyžádat od oddělení technických služeb společnosti QIAGEN či místního distributora.

# Historie revizí dokumentu

## Revize

## Popis

R1, červen 2022

Verze 3, revize 1

- Aktualizace soupravy na verzi 3 kvůli souladu s nařízením IVDR
- Aktualizace oddílu Popis a principy
- Aktualizace oddílů Dodávané materiály (přidání účinných složek) a Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky
- Aktualizace oddílu Varování a bezpečnostní opatření (doplnění informací o mimořádných událostech a oddílu Likvidace)
- Aktualizace oddílu Skladování reagentů a manipulace s nimi
- Aktualizace oddílu Odběr a skladování vzorků a manipulace s nimi
- Aktualizace oddílu Důležité poznámky a Postup
- Aktualizace oddílu Omezení
- Aktualizace oddílu Charakteristika funkčních vlastností
- Aktualizace oddílu Symboly
- Aktualizace oddílu Informace pro objednání

Tato stránka je úmyslně ponechána prázdná.

#### Omezené licenční ujednání pro soupravu QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Používáním tohoto výrobku vyjadřuje kterýkoliv kupující nebo uživatel produktu svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v panelu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v tomto panelu, společně s kterýmkoliv součástí, které nejsou v tomto panelu obsaženy, s výjimkou případů popsaných v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tento panel a/nebo jeho použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tento panel a jeho komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přeprocessovat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoli další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakémukoli shora zakázané činnosti nebo ji usnadnit. Společnost QIAGEN může prosazovat zájazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem a/nebo jeho součástmi.

Aktualizované licenční podmínky jsou uvedeny na webových stránkách [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube® (skupina QIAGEN); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co. KG).

Červen-2022 HB-3030-001 1127543CS © 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Technická podpora [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) |  
Webová stránka [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)