

QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit Handbuch



Version 2



IVD Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

REF 61104

HB 1071108DE

 QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden

Tel.: +49-2103-29-0

R2 **MAT** 1071108DE



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN ist der führende Anbieter von innovativen Probenvorbereitungs- und Testtechnologien, die die Isolierung und die Analyse von Nukleinsäuren und Proteinen in jedem biologischen Probenmaterial ermöglicht. Unsere fortschrittlichen, qualitativ hochwertigen Produkte und Dienstleistungen stellen den Erfolg von der Probe bis zum Ergebnis sicher.

QIAGEN setzt Standards in:

- der Reinigung von DNA, RNA und Proteinen,
- Nukleinsäure- und Protein-Assays,
- microRNA-Forschung und RNAi sowie
- der Automatisierung von Probenvorbereitungs- und Testtechnologien.

Unsere Mission ist es, Ihnen herausragende Erfolge und bahnbrechend neue Erkenntnisse bei Ihrer Forschung zu ermöglichen. Weitere Informationen finden Sie auf der Website www.qiagen.com.

Inhaltsverzeichnis

Vorgesehener Verwendungszweck	4
Kurze Zusammenfassung des Verfahrens	4
Lyse der Blutzellen	5
Bindung genomischer DNA an die QIAamp Mini Spinsäulen-Membran	5
Automatisierte Reinigung	5
Mit dem Kit gelieferte Materialien	8
Kit-Inhalt	8
Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien	9
Sicherheitshinweise	10
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	12
Handhabung und Lagerung der Proben	12
Wichtige Hinweise	14
Wichtige Hinweise vor Beginn der Nukleinsäure-Reinigung	14
Vorbereitung der Reagenzien und Puffer	14
Handhabung der QIAamp Mini-Spinsäulen	16
Elution genomischer DNA	16
Ausbeute und Qualität genomischer DNA	16
Vorbereitung des QIAvac 24 Plus Vakuumsystems	17
Protokolle	
■ Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus Blutproben mit einem Vakuumsystem (Vakuum-Protokoll)	19
■ Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus Blutproben mit einer Mikrozentrifuge (Spin-Protokoll)	23
Qualitätskontrolle	26
Leistungscharakteristik	26
Leistungsfähigkeit in nachfolgenden Tests	27
Symbole	32
Literaturhinweis	33
Kontaktinformationen	34
Bestellinformationen	35

Vorgesehener Verwendungszweck

Der QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit ist ein System, das auf der Silica-membran-Technologie (der QIAamp Technologie) für die Isolierung und Reinigung genomischer Nukleinsäuren aus biologischen Probenmaterialien basiert.

Das Produkt sollte nur von Sachkundigen, wie z. B. technischen Angestellten, Laboranten oder Ärzten, die in der Anwendung molekularbiologischer Methoden geschult sind, verwendet werden.

Der QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit ist für in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen.

Kurze Zusammenfassung des Verfahrens

Der QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit basiert auf einer langjährig bewährten Technologie und bietet eine schnelle und einfache Methode für die Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus 200 µl Vollblut.

Die Protokolle für den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wurden für die gleichzeitige Verarbeitung mehrerer Blutproben entwickelt. Sie ergeben eine reine DNA, die direkt für Folgeapplikationen verwendet werden kann. Die Protokolle sind sowohl für die Verwendung von frischem als auch gefrorenem Vollblut sowie für Blutproben geeignet, die mit Citrat oder EDTA (als Antikoagulans) behandelt wurden.

Die Spin- und Vakuum-Variante des einfachen QIAamp DSP DNA Blood Mini Verfahrens eignen sich für die gleichzeitige Verarbeitung mehrerer Proben. Zur Steigerung der Standardisierung und Vereinfachung der Arbeitsabläufe können einige der QIAamp Spin-Protokolle mit dem QIAcube® automatisiert werden (siehe Seite 5).

Eine vorherige Abtrennung der Leukozyten ist nicht notwendig. Die Protokolle beinhalten weder eine Phenol/Chloroform-Extraktion noch eine Alkohol-Fällung und erfordern nur wenige manuelle Eingriffe durch den Anwender, sodass eine sichere Handhabung von potenziell infektiösen Proben möglich ist. Die Protokolle wurden so konzipiert, dass die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzkontamination von Probe zu Probe minimiert ist. Die gereinigte DNA kann direkt in einer PCR oder anderen Applikationen eingesetzt oder zur späteren Verwendung bei –25 bis –15 °C gelagert werden.

Das Prinzip des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kits und seine Anwendung

Jedes Protokoll für den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit besteht aus vier Arbeitsschritten:

- Lyse der Zellen in der Blutprobe
- Bindung der genomischen DNA im Zelllysate an die Membran einer QIAamp Mini-Spinsäule
- Waschen der Membran
- Elution der genomischen DNA von der Membran

Dieses Handbuch enthält zwei Protokolle für die DNA-Isolierung mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit: das Spin-Protokoll, für das eine Zentrifuge erforderlich ist, und das Vakuum-Protokoll, für das eine Zentrifuge und ein Vakuumsystem benötigt werden (siehe Flussdiagramm auf Seite 7).

Lyse der Blutzellen

Die Proben werden unter denaturierenden Bedingungen bei erhöhten Temperaturen lysiert. Die Lyse erfolgt in Gegenwart der QIAGEN Protease (QP) in Lysepuffer (AL).

Bindung genomischer DNA an die QIAamp Mini Spinsäulen-Membran

Um die adsorptive Bindung der genomischen DNA an die Membran der QIAamp Mini-Spinsäulen zu optimieren, werden die Lysate zuerst mit Ethanol versetzt. Jedes Lysat wird dann auf eine QIAamp Mini-Spinsäule aufgetragen und mittels Unterdruck (Vakuum) oder Zentrifugalkraft durch die Silicagel-Membran gesaugt, wobei die genomische DNA an die Membran gebunden wird.

Automatisierte Reinigung

Die Reinigung der DNA mithilfe des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kits kann mit dem QIAcube vollständig automatisiert werden. Der innovative QIAcube verwendet hochmoderne Technologien bei der Verarbeitung der Proben in den QIAGEN Spinsäulen; damit lässt sich die automatisierte Probenverarbeitung bei niedrigem Durchsatz nahtlos in Ihre Labor-Arbeitsabläufe integrieren. Die Probenverarbeitung mit dem QIAcube erfolgt nach denselben Arbeitsschritten wie beim manuellen Protokoll (d. h. Lysieren, Binden, Waschen und Eluieren), sodass Sie weiterhin den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit zur Isolierung qualitativ hochwertiger DNA verwenden können.

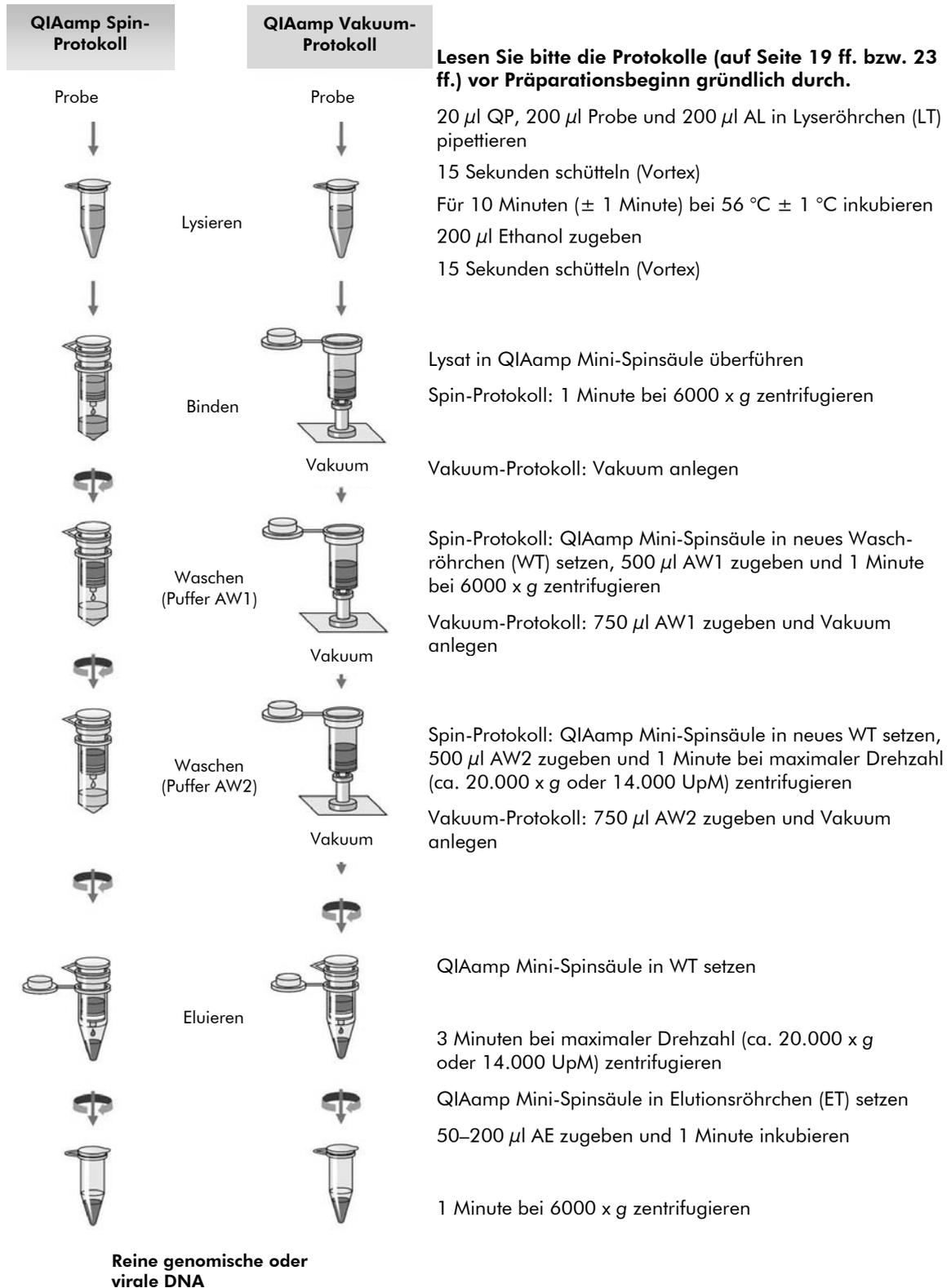
Weitere Informationen über das automatisierte Verfahren finden Sie im entsprechenden Protokollblatt, das unter www.qiagen.com/MyQIAcube zur Verfügung steht. Aktualisierte Protokollblätter können kostenfrei heruntergeladen oder beim Technischen Service von QIAGEN (siehe Seite 34) angefordert werden.

Bei der automatisierten Durchführung des QIAamp DSP DNA Blood Mini Verfahrens mit dem QIAcube kann das Gerät aufgrund von Totvolumina, Verdunstung und zusätzlichem Reagenzienverbrauch durch das automatische Pipettieren eventuell weniger als 50 Proben verarbeiten. QIAGEN garantiert nur bei manueller Durchführung des Verfahrens mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, dass 50 Probenverarbeitungen durchgeführt werden können.



Abbildung 1. Der QIAcube.

Spin- und Vakuum-Protokoll für den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



Mit dem Kit gelieferte Materialien

Kit-Inhalt

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit			
Katalog-Nr.			61104
Anzahl Präparationen			50*
QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (WT) (2 ml) (QIAamp Mini-Spinsäulen mit 2-ml-Waschröhrchen)		50
ET	Elution Tubes (1,5 ml) (1,5-ml-Elutionsröhrchen)		50
VC	VacConnectors (Luerverbinder)		50
LT	Lysis Tubes (1.5 ml) (1,5-ml-Lyseröhrchen)		50
WT	Wash Tubes (2 ml) (2-ml-Waschröhrchen)		3 x 50
AL	Lysis Buffer (Lysepuffer) [†]		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 [†] (concentrate) (Waschpuffer 1 [Konz.])		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [‡] (concentrate) (Waschpuffer 2 [Konz.])		13 ml
AE	Elution Buffer [‡] (Elutionspuffer)		25 ml
PS	Protease Solvent [‡] (Protease-Lösungsmittel)		2 ml
QP	QIAGEN Protease [§]		1 Fläschchen
	CD		1
	Handbuch		1

* Bei der automatisierten Durchführung des QIAamp DSP DNA Blood Mini Verfahrens mit dem QIAcube kann das Gerät aufgrund von Totvolumina, Verdunstung und zusätzlichem Reagenzienverbrauch durch das automatische Pipettieren eventuell weniger als 50 Proben verarbeiten. QIAGEN garantiert nur bei manueller Durchführung des QIAamp DSP DNA Blood Mini Verfahrens, dass mit dem Kit 50 Proben verarbeitet werden können.

† Enthält Guanidinhydrochlorid. Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Chlorbleiche (Natriumhypochlorit, NaOCl) enthalten. Auf Seite 11 finden Sie weitere Sicherheitshinweise.

‡ Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

§ Resuspendieren Sie den Röhrcheninhalt in einem Volumen von 1,2 ml. Siehe auch „Vorbereitung der QIAGEN Protease“ auf Seite 27.

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern (*Material Safety Data Sheets, MSDS*) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Für das Spin- und das Vakuum-Protokoll

- Ethanol (96–100 %)
- Pipetten* und Pipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir dringend, Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zu benutzen)
- Einmalhandschuhe
- Heizblock* für die Lyse der Proben bei 56 °C (wir empfehlen den Eppendorf® Thermomixer comfort mit einem Thermoblock für 1,5-ml-Mikro-Reaktionsgefäße†)
- Mikrozentrifuge*
- Messzylinder (50 ml)
- Laborschüttler (Vortex)

Nur für das Vakuum-Protokoll

- QIAvac 24 Plus Vakuumsystem (QIAvac 24 Plus, Kat.-Nr. 19413, QIAvac Verbindungssystem, Kat.-Nr. 19419 und Vakuumpumpe, Kat.-Nr. 84020) oder ein gleichwertiges universell einsetzbares Labor-Vakuumsystem

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte (z. B. Pipetten und Heizblock) regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft und kalibriert werden, damit die ordnungsgemäße Verarbeitung der Proben nach den QIAamp DSP DNA Blood Mini Protokollen gewährleistet ist.

† Diese Liste der Anbieter erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Sicherheitshinweise

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheits-Datenblättern entnehmen (*Material Safety Data Sheets*, MSDS). In unserer Online-Sammlung der Materialsicherheits-Datenblätter unter www.qiagen.com/support/MSDS.aspx finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige MSDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.

ACHTUNG: GEBEN SIE KEINE Chlorbleiche oder saure Lösungen direkt in den Flüssigabfall, der während der Probenverarbeitung anfällt.

Der Lysepuffer (AL) und Waschpuffer 1 (AW1) enthalten Guanidinhydrochlorid, das sehr reaktive Verbindungen bilden kann, wenn es mit Chlorbleiche zusammengebracht wird. Wenn eine Flüssigkeit, die einen oder mehrere dieser Puffer enthält, verschüttet wird, reinigen Sie die betroffenen Flächen mit einem geeigneten Labordetergens und Wasser. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Agenzien, reinigen Sie die Fläche zuerst mit Detergens und Wasser, danach mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit. Tragen Sie bei der Entsorgung von beschädigten oder undichten Pufferflaschen Handschuhe und Schutzbrille, um eine persönliche Verletzung oder Verletzungsgefahr für andere zu vermeiden.

Der Flüssigabfall, der während der Probenverarbeitung nach den Protokollen für den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit anfällt, ist von QIAGEN nicht auf eventuell noch vorhandenes infektiöses Material getestet worden. Eine Kontamination des Flüssigabfalls mit Resten infektiösen Materials ist unwahrscheinlich, kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Behandeln Sie den Flüssigabfall daher als potenziell infektiös und werfen Sie ihn gemäß den anzuwendenden Sicherheitsbestimmungen.

Die folgenden Gefahrenhinweise und Sicherheitsratschläge (R- und S-Sätze) gelten für einzelne Reagenzien des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kits:

Lysepuffer (AL) und Waschpuffer 1 (AW1)



Enthalten Guanidiniumhydrochlorid: gesundheitsschädlich, reizend. R- und S-Sätze:* R22-36/38, S13-26-36-46.

QIAGEN Protease (QP)



Enthält Subtilisin: sensibilisierend, reizend. R- und S-Sätze:* R37/38-41-42, S22-24-26-36/37/39-46.

24-Stunden-Giftnotruf

Im Notfall können Sie 24 Stunden am Tag medizinische Informationen (in englischer, französischer und deutscher Sprache) erhalten über den:

Giftnotruf der Beratungsstelle bei Vergiftungen in Mainz (Deutschland),

Tel.: +49-6131-19240

* R22: Gesundheitsschädlich beim Verschlucken. R36/38: Reizt die Augen und die Haut. R37/38: Reizt die Atmungsorgane und die Haut. R41: Gefahr ernster Augenschäden. R42: Sensibilisierung durch Einatmen möglich. S13: Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten. S22: Staub nicht einatmen. S24: Berührung mit der Haut vermeiden. S26: Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren. S36: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. S36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen. S46: Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

QIAamp Mini-Spinsäulen sollten nach Erhalt bei 2–8 °C gelagert werden und können bis zum Haltbarkeitsdatum auf der Kit-Verpackung verwendet werden.

Alle Puffer können bei Raumtemperatur (15–25 °C) gelagert werden und sind mindestens bis zum Haltbarkeitsdatum auf der Kit-Verpackung stabil.

Die lyophilisierte QIAGEN Protease (QP) kann bei Raumtemperatur (15–25 °C) mindestens bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum gelagert werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Funktion kommt. In Protease-Lösungsmittel rekonstituierte QIAGEN Protease ist bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu ein Jahr, höchstens jedoch bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum, stabil.

Waschpuffer 1 (AW1) und Waschpuffer 2 (AW2) sind nach Rekonstitution bei Lagerung bei Raumtemperatur (15–25 °C) bis zu ein Jahr, höchstens jedoch bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum, stabil.

Handhabung und Lagerung der Proben

Kryopräzipitate, die sich beim Auftauen gefrorener Proben bilden, verstopfen die Membran der QIAamp Mini-Spinsäule. Wenn Kryopräzipitate sichtbar sind, dürfen diese beim Pipettieren der Probe nicht mit angesaugt werden. Die Auswirkungen des Einfrierens und Wiederauftauens von Blutproben auf die DNA-Reinigung mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wurden experimentell untersucht (siehe Abb. 2).

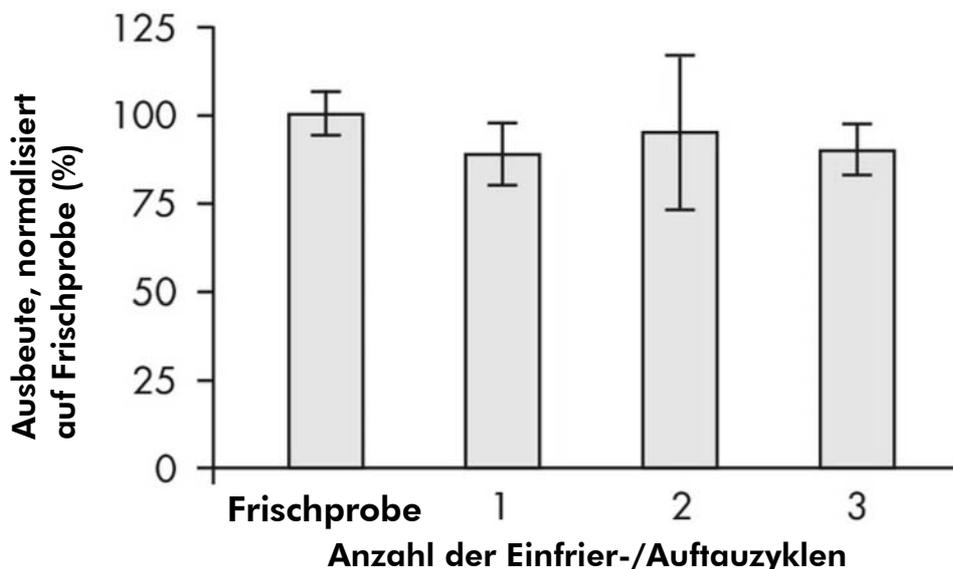


Abbildung 2. Einfluss des wiederholten Einfrierens und Auftauens der Blutproben auf die DNA-Ausbeute. Mit EDTA behandeltes Blut wurde bis zu 3-mal eingefroren und wieder aufgetaut und anschließend einer DNA-Reinigung mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit unterzogen. Die ermittelten DNA-Ausbeuten sind auf die Ausbeute bei der Frischprobe normalisiert (100 %). Jeder Balken im Diagramm stellt die Ergebnisse von 32 Wiederholproben dar (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Die Menge an DNA, die bei Anwendung der QIAamp DSP DNA Blood Mini Verfahren gereinigt wird, ist abhängig von der Leukozytenzahl in der Probe. Sowohl beim Spin- als auch beim Vakuum-Protokoll wird genomische DNA aus einer 200- μ l-Blutprobe (von gesunden Spendern) gereinigt. Zur Entnahme der Blutproben für die QIAamp DSP DNA Blood Mini Protokolle können verschiedene Blutentnahmeröhrchen (auch Primärröhrchen genannt) mit unterschiedlichen Antikoagulanzen eingesetzt werden (siehe Tab. 1).

Tabelle 1. Durchschnittliche DNA-Ausbeute aus Blutproben, die unter Verwendung verschiedener Primärröhrchen und Antikoagulanzen entnommen wurden

Primärröhrchen	Hersteller	Kat.-Nr.	Nominal- Volumen	Durchschnittl. Ausbeute*
BD™ Vacutainer® 9NC	BD	366007	9 ml	6,4 μ g
BD Vacutainer K3E	BD	36847	10 ml	6,6 μ g
BD Vacutainer K2E	BD	367864	6 ml	6,4 μ g
S-Monovette® EDTA	Sarstedt®	02.1066.001	9 ml	6,5 μ g
S-Monovette CPDA1	Sarstedt	01.1610.001	8,5 ml	6,3 μ g
Vacurette® K3E	Greiner Bio- One®	455036	9 ml	6,5 μ g
Vacurette 9NC	Greiner Bio- One	454382	2 ml	6,3 μ g

Für die Reinigung der genomischen DNA wurden 200- μ l-Blutproben (mit $4,0 \times 10^6$ Zellen/ml bis $9,0 \times 10^6$ Zellen/ml) von gesunden Spendern verwendet.

* Für jeden Primärröhrchen-Typ wurde die durchschnittliche Ausbeute aus 11 Dreifachbestimmungen ermittelt.

Entfernen verbliebener Kontaminationen

Während die genomische DNA an die Membran der QIAamp Mini-Spinsäule gebunden ist, werden verbleibende Verunreinigungen in zwei Waschschrritten effizient entfernt, ohne die Bindung der DNA zu beeinflussen: zuerst mit Waschpuffer 1 (AW1) und anschließend mit Waschpuffer 2 (AW2).

Elution gereinigter genomischer DNA

Die genomische DNA wird mit 50–200 μl Elutionspuffer (AE) von der Membran der QIAamp Mini-Spinsäule eluiert. Die eluierte DNA kann direkt in nachfolgenden Tests, u. a. in verschiedenen in-vitro-diagnostischen Assays, eingesetzt werden.

Wichtige Hinweise

Wichtige Hinweise vor Beginn der Nukleinsäure-Reinigung

- Überprüfen Sie alle Kit-Komponenten auf Beschädigung, nachdem Sie den Kit bekommen haben. Bei Beschädigungen der Blisterverpackungen oder der Pufferflaschen wenden Sie sich an den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Lieferanten. Im Falle von verschütteten/ausgelaufenen Flüssigkeiten lesen Sie bitte den Abschnitt „Sicherheitshinweise“ (siehe Seite 10). Verwenden Sie keine beschädigten Kit-Komponenten, da die Leistungsfähigkeit des Kits dadurch beeinträchtigt sein könnte.
- Wechseln Sie nach jedem Pipettierschritt die Pipettenspitzen. Als Schutz vor Kreuzkontaminationen empfehlen wir die Verwendung von Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere.
- Alle Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt.
- Tragen Sie stets Einmalhandschuhe und überprüfen Sie regelmäßig, ob sie nicht mit Probenmaterial kontaminiert sind. Entsorgen Sie die Handschuhe, falls sie kontaminiert wurden.
- Öffnen Sie immer nur ein Gefäß, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Kombinieren Sie nicht die Komponenten verschiedener Kits miteinander, es sei denn, die Chargennummern sind identisch.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Kit-Reagenzien.
- Um das Risiko einer Infektion durch potenziell infektiöses Material so gering wie möglich zu halten, empfehlen wir, bis zur Lyse der Proben an einer sterilen Werkbank (mit laminarem Luftstrom) zu arbeiten.
- Dieser Kit sollte nur von Personal verwendet werden, das in Verfahren der In-vitro-Labordiagnostik geschult ist.

Vorbereitung der Reagenzien und Puffer

■ Vorbereitung der QIAGEN Protease

Geben Sie 1,2 ml Protease-Lösungsmittel („Protease Solvent“, PS) in das Fläschchen mit lyophilisierter QIAGEN Protease (QP) und mischen Sie die Lösung sorgfältig. Drehen Sie dazu das Fläschchen mehrmals um, um

Schaumbildung zu vermeiden. Vergewissern Sie sich, dass die QIAGEN Protease (QP) vollständig gelöst ist.

- ① Geben Sie die QIAGEN Protease (QP) nicht direkt in den Lysepuffer (AL).

■ **Vorbereitung von Waschpuffer 1**

Geben Sie mithilfe eines Messzylinders 25 ml Ethanol (96–100 %) in die Flasche mit 19 ml Waschpuffer-1-(AW1-)Konzentrat. Lagern Sie den rekonstituierten Waschpuffer 1 (AW1) bei Raumtemperatur (15–25 °C).

- ① Mischen Sie den rekonstituierten Waschpuffer 1 (AW1) stets vor Präparationsbeginn durch mehrmaliges Umdrehen der Flasche.

■ **Vorbereitung von Waschpuffer 2**

Geben Sie mithilfe eines Messzylinders 30 ml Ethanol (96–100 %) in die Flasche mit 13 ml Waschpuffer-2-(AW2-)Konzentrat. Lagern Sie den rekonstituierten Waschpuffer 2 (AW2) bei Raumtemperatur (15–25 °C).

- ① Mischen Sie den rekonstituierten Waschpuffer 2 (AW2) stets vor Präparationsbeginn durch mehrmaliges Umdrehen der Flasche.

■ **Vorbereitung des Elutionspuffers**

Im Kit ist eine Flasche Elutionspuffer (AE) enthalten. Um eine Kontamination des Elutionspuffers (AE) zu vermeiden, empfehlen wir, bei der Entnahme von Elutionspuffer (AE) aus der Flasche Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zu verwenden und die Flasche sofort nach Entnahme wieder zu verschließen.

- ① Der Elutionspuffer (AE) enthält das Konservierungsmittel Natriumazid, das eine Absorption bei 260 nm zeigt. Daher sollte bei der Quantifizierung der DNA im Eluat durch Absorptionsmessung bei 260 nm, bei der Bestimmung der DNA-Reinheit im Eluat durch Absorptionsmessungen bei 260 nm und 280 nm sowie bei Aufnahme eines Spektrums zwischen 220 und 350 nm die Leerwertprobe dieselbe Natriumazid-Konzentration enthalten wie das Eluat. Bereiten Sie z. B. das DNA-Eluat für die Absorptionsmessungen durch Verdünnen von 50 µl Eluat mit 100 µl Wasser vor und stellen Sie dann die Leerwert-Probe durch Verdünnen von 50 µl Elutionspuffer (AE) mit 100 µl Wasser her. Verwenden Sie für die Verdünnungen frisches, destilliertes Wasser.

Handhabung der QIAamp Mini-Spinsäulen

Aufgrund der Empfindlichkeit von Nukleinsäure-Amplifikationstechniken sollten Sie die folgenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung der QIAamp Mini-Spinsäulen beachten, um eine Kreuzkontamination bei der Probenverarbeitung zu vermeiden:

- Tragen Sie die Probe oder Lösung vorsichtig auf die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule auf. Pipettieren Sie die Probe in die QIAamp Mini-Spinsäule, ohne den Rand der Säule zu benetzen.
- Wechseln Sie nach jedem Pipettierschritt die Pipettenspitzen. Es empfiehlt sich, Pipettenspitzen mit integriertem Filter (als Schutz vor Kreuzkontaminationen durch Aerosole) zu verwenden.
- Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.
- Zentrifugieren Sie die Reaktionsgefäße nach allen Mischvorgängen (auf dem Vortex) ganz kurz, um Kreuzkontaminationen durch Verspritzen von Probenflüssigkeit im Deckelinneren beim Öffnen der Gefäße zu vermeiden.
- Öffnen Sie vorsichtig immer nur eine QIAamp Mini-Spinsäule und vermeiden Sie Aerosolbildung.
- Tragen Sie während der gesamten Präparation Laborhandschuhe. Falls Sie mit der Probe in Kontakt geraten sollten, wechseln Sie sofort die Handschuhe.

Elution genomischer DNA

Das Volumen der von einer QIAamp Mini-Spinsäule eluierten DNA kann bis zu 20 µl geringer sein als das auf die Spinsäule gegebene Volumen des Elutionspuffers (AE). Das wiedergefundene Eluatvolumen hängt von der Art der Probe ab. Der Elutionspuffer (AE) sollte auf Raumtemperatur (15–25 °C) äquilibriert sein, bevor er auf die Spinsäule gegeben wird. Die eluierte DNA wird in Elutionsröhrchen (ET) aufgefangen. Falls die DNA bis zu vier Wochen aufbewahrt werden soll, empfehlen wir eine Lagerung bei 2–8 °C. Zur längeren Aufbewahrung empfehlen wir eine Lagerung bei –20 °C.

Ausbeute und Qualität genomischer DNA

Die isolierte genomische DNA ist hinsichtlich der Ausbeute und Qualität für nachfolgende molekulardiagnostische Nachweisverfahren jeglicher Art geeignet. Die diagnostischen Tests sollten gemäß den Angaben des jeweiligen Herstellers durchgeführt werden.

Vorbereitung des QIAvac 24 Plus Vakuumsystems

Vergewissern Sie sich, dass Sie die QIAamp Mini-Spinsäule, den VacConnector (VC, Luerverbinder) und das VacValve Vakuumentil richtig zusammensetzen (siehe Abb. 3).

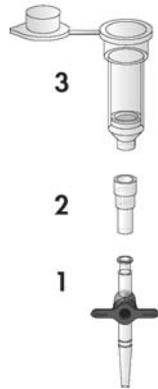


Abbildung 3. Zusammensetzen der Komponenten des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kits zur Verarbeitung von Proben nach dem Vakuum-Protokoll.

1. VacValve Vakuumentil (im Lieferumfang des Vakuumsystems enthalten)
2. VacConnector Luerverbinder (VC)
3. QIAamp Mini-Spinsäule

Um eine Verwechslung der Proben zu vermeiden, empfehlen wir bei Anwendung des Vakuum-Protokolls mit dem QIAvac 24 Plus Vakuumsystem, die Lyseröhrchen (LT), Elutionsröhrchen (ET) und QIAamp Mini-Spinsäulen gemäß dem Schema in Abbildung 4 zu beschriften. Diese Abbildung können Sie fotokopieren und mit den Bezeichnungen der Proben beschriften. Wir empfehlen, ein ähnliches Schema zu verwenden, wenn Sie ein anderes Vakuumsystem benutzen oder das Spin-Protokoll durchführen.

Datum: _____

Laborant: _____

Lauf-Nr.: _____

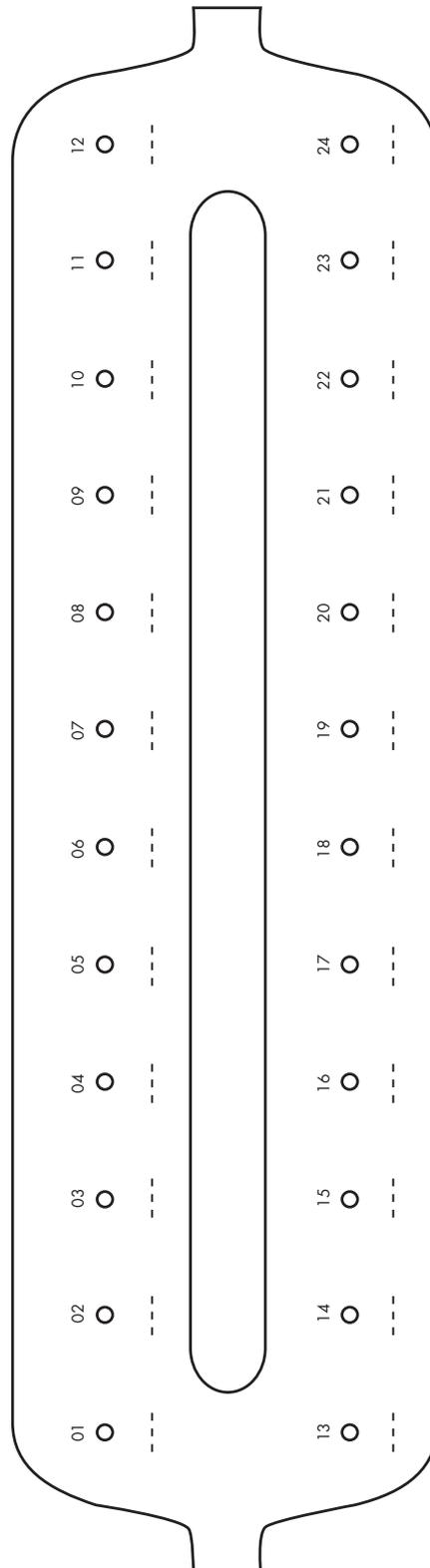


Abbildung 4. Beschriftungsschema für Lyserröhrchen (LT), Elutionsröhrchen (ET) und QIAamp Mini-Spinsäulen bei Verwendung auf dem QIAvac 24 Plus Vakuumsystem.

Protokoll: Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus Blutproben mit einem Vakuumsystem (Vakuum-Protokoll)

Zur Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus 200 µl mit EDTA oder Citrat behandelten Vollblutproben mithilfe eines Vakuumsystems (z. B. QIAvac 24 Plus).

Wichtige Hinweise vor Präparationsbeginn

- Die folgenden Anweisungen zur Durchführung des Protokolls beziehen sich auf die Verarbeitung einer einzelnen Blutprobe. Mit dem QIAvac 24 Plus Vakuumsystem können jedoch bis zu 24 Proben gleichzeitig verarbeitet werden.

Vor Protokollbeginn durchzuführende Arbeiten

- Äquilibrieren Sie die Blutproben auf Raumtemperatur (15–25 °C) und vergewissern Sie sich, dass sie gut durchmischt sind.
- Falls sich im Lysepuffer (AL) ein Niederschlag gebildet hat, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 56 °C auf.
- Vergewissern Sie sich, dass Waschpuffer 1 (AW1), Waschpuffer 2 (AW2) und die QIAGEN Protease (QP) gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien und Puffer“ auf den Seiten 14 und 15 vorbereitet wurden.
- Äquilibrieren Sie den für Schritt 14 benötigten Elutionspuffer (AE) auf Raumtemperatur (15–25 °C).
- Temperieren Sie für Schritt 4 einen Heizblock auf 56 °C.
- Stecken Sie als Schutz vor Kreuzkontaminationen einen VacConnector (VC) auf jeden Luer-Adapter des Vakuumsystems.
- Bei der Qualitätskontrolle von QIAGEN wird jede Kit-Charge vor der Freigabe einer Funktionsüberprüfung unterzogen. Mischen Sie daher nicht Reagenzien verschiedener Kit-Chargen miteinander und kombinieren Sie auch nicht einzelne Reagenzien aus unterschiedlichen Reagenzien-Chargen.
- Vergewissern Sie sich, dass die Abfallflasche des Vakuumsystems leer ist und alle Verbindungsstücke richtig angeschlossen sind.
- Einzelheiten zur Bedienung des Vakuumsystems, insbesondere zur Wartung, entnehmen Sie bitte dem Handbuch des jeweiligen Systems.

Durchführung

1. **Pipettieren Sie 20 µl QIAGEN Protease (QP) in ein Lyseröhrchen (LT).**

i Überprüfen Sie vor Gebrauch das Verfallsdatum der gelösten Protease.

2. **Geben Sie 200 µl Blutprobe in ein Lyseröhrchen (LT).**
3. **Pipettieren Sie 200 µl Lysepuffer (AL) hinzu, verschließen Sie den Deckel und mischen Sie durch Schütteln für 15 Sekunden auf einem Vortex-Mischer.**

Um eine effiziente Lyse sicherzustellen, ist es besonders wichtig, Probe und Lysepuffer (AL) sofort und gründlich zu mischen, bis eine homogene Lösung vorliegt.

i Achten Sie wegen der hohen Viskosität des Lysepuffers (AL) besonders auf eine korrekte Dosierung des Lysepuffers (AL), indem Sie sorgfältig pipettieren oder eine entsprechend geeignete Pipette verwenden.

i Geben Sie die QIAGEN Protease (QP) nicht direkt in den Lysepuffer (AL).

4. **Inkubieren Sie für 10 Minuten (± 1 Minute) bei 56 °C (± 1 °C).**
5. **Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) kurz (ca. 5 Sekunden) bei maximaler Drehzahl, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**
6. **Geben Sie 200 µl Ethanol (96–100 %) in das Lyseröhrchen (LT), schließen Sie den Deckel und mischen Sie gründlich für ≥ 15 Sekunden auf einem Vortex-Laborschüttler.**
7. **Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) kurz (ca. 5 Sekunden) bei maximaler Drehzahl, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**
8. **Stecken Sie die QIAamp Mini-Spinsäule in einen VacConnector (VC) auf dem Vakuumsystem. Vergewissern Sie sich, dass das Haupt-Vakuumentil (zwischen Vakuumsystem und Vakuumkammer) und das Schraubdeckel-Ventil (auf der Vakuumkammer) geschlossen sind. Schalten Sie die Vakuumpumpe ein.**

Verwerfen Sie das 2-ml-Waschröhrchen (WT), in dem die QIAamp Mini-Spinsäule in der Blisterverpackung steckte.

Das Vakuum liegt nur am Verbindungssystem (sofern verwendet) und nicht an der Vakuumkammer an.

9. **Geben Sie das gesamte Lysat aus Schritt 7 vorsichtig – ohne den oberen Rand zu benetzen – in die QIAamp Mini-Spinsäule.**

Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.

- ⓘ Bei der gleichzeitigen Verarbeitung mehrerer Proben empfehlen wir, immer nur ein Lyseröhrchen (LT) zu öffnen.

10. Öffnen Sie das Haupt-Vakuumventil. Wenn das Lysat vollständig durch die Membran der QIAamp Mini-Spinsäule gesaugt ist, schließen Sie das Haupt-Vakuumventil und öffnen das Schraubdeckel-Ventil an der Vakuumkammer, um die Vakuumkammer zu belüften. Schließen Sie das Schraubdeckel-Ventil wieder, nachdem Druckausgleich hergestellt ist und in der Kammer kein Vakuum mehr anliegt.

Nach Schließen des Haupt-Vakuumventils liegt bei Verwendung des Verbindungssystems das Vakuum nur an diesem an und nicht an der Vakuumkammer.

- ⓘ Verwenden Sie das Schraubdeckel-Ventil der Vakuumkammer, um das Vakuum schnell aufzuheben.
- ⓘ Bei der gleichzeitigen Verarbeitung mehrerer Proben mit QIAamp Mini-Spinsäulen empfehlen wir, das VacValve jeder Säule nach dem Durchsaugen des Lysats zu schließen, um die Dauer dieses Vakuumschritts zu verkürzen.
- ⓘ Wenn das Lysat die Membran nach 10 Minuten nicht vollständig passiert hat, setzen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT), schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie für 3 Minuten bei 6000 x g (8000 UpM), bis das Lysat die Membran vollständig passiert hat. Setzen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule in ein anderes sauberes Waschröhrchen (WT) und fahren Sie dann mit Schritt 10 des (Spin-)Protokolls auf Seite 24 fort.
- ⓘ Sollte das Lysat während der Zentrifugation immer noch nicht die Membran passieren, werfen Sie die Probe und wiederholen Sie das Isolierungs- und Reinigungsprotokoll mit einer neuen Probe beginnend bei Schritt 1 auf Seite 20.

11. Geben Sie 750 µl Waschpuffer 1 (AW1) auf die QIAamp Mini-Spinsäule, ohne den oberen Rand zu benetzen. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren. Lassen Sie den Deckel der Spinsäule geöffnet und schließen Sie das Haupt-Vakuumventil. Wenn der Waschpuffer 1 (AW1) vollständig durch die Membran der QIAamp Mini-Spinsäule gesaugt ist, schließen Sie das Haupt-Vakuumventil und öffnen das Schraubdeckel-Ventil an der Vakuumkammer, um die Vakuum-

kammer zu belüften. Schließen Sie das Schraubdeckel-Ventil wieder, nachdem Druckausgleich hergestellt ist und in der Kammer kein Vakuum mehr anliegt.

12. Geben Sie 750 µl Waschpuffer 2 (AW2) auf die QIAamp Mini-Spinsäule, ohne den oberen Rand zu benetzen. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren. Lassen Sie den Deckel der Spinsäule geöffnet und schließen Sie das Haupt-Vakuumventil. Wenn der Waschpuffer 2 (AW2) vollständig durch die Membran der QIAamp Mini-Spinsäule gesaugt ist, schließen Sie das Haupt-Vakuumventil und öffnen das Schraubdeckel-Ventil an der Vakuumkammer, um die Vakuumkammer zu belüften. Schließen Sie das Schraubdeckel-Ventil wieder, nachdem Druckausgleich hergestellt ist und in der Kammer kein Vakuum mehr anliegt.
13. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule, nehmen Sie sie vom Vakuumsystem ab und werfen Sie den VacConnector (VC). Setzen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT) und zentrifugieren Sie für 3 Minuten bei maximaler Drehzahl (ca. 20.000 x g bzw. 14.000 UpM), um die Membran vollständig zu trocknen.

i Das Auslassen des Zentrifugationsschritts zur Trocknung der Membran kann zu einer Beeinträchtigung des nachfolgenden Tests führen.

14. Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Elutionsröhrchen (ET) und werfen Sie das benutzte Waschröhrchen (WT) mitsamt Filtrat. Öffnen Sie vorsichtig den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und tragen Sie 50 bis 200 µl Elutionspuffer (AE) auf die Mitte der Membran auf. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie für 1 Minute bei Raumtemperatur (15–25 °C). Zentrifugieren Sie für 1 Minute bei etwa 6000 x g (8000 UpM), um die DNA zu eluieren.

i Führen Sie im Anschluss an dieses Protokoll das Wartungsverfahren für das Vakuumsystem durch (weitere Einzelheiten dazu entnehmen Sie bitte dem Handbuch zum Vakuumsystem).

Protokoll: Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus Blutproben mit einer Mikrozentrifuge (Spin-Protokoll)

Zur Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus 200 μ l mit EDTA oder Citrat behandelten Vollblutproben mithilfe einer Mikrozentrifuge.

Wichtige Hinweise vor Präparationsbeginn

- Die folgenden Anweisungen zur Durchführung des Protokolls beziehen sich auf die Verarbeitung einer einzelnen Blutprobe. Es können jedoch mehrere Proben gleichzeitig verarbeitet werden; die Anzahl hängt von der Kapazität der verwendeten Mikrozentrifuge ab.

Vor Protokollbeginn durchzuführende Arbeiten

- Äquilibrieren Sie die Blutproben auf Raumtemperatur (15–25 °C) und vergewissern Sie sich, dass sie gut durchmischt sind.
- Falls sich im Lysepuffer (AL) ein Niederschlag gebildet hat, lösen Sie diesen durch Erwärmen auf 56 °C auf.
- Vergewissern Sie sich, dass Waschpuffer 1 (AW1), Waschpuffer 2 (AW2) und die QIAGEN Protease (QP) gemäß den Anweisungen im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien und Puffer“ auf den Seiten 14 und 15 vorbereitet wurden.
- Äquilibrieren Sie den für Schritt 15 benötigten Elutionspuffer (AE) auf Raumtemperatur (15–25 °C).
- Temperieren Sie für Schritt 4 einen Heizblock auf 56 °C.
- Bei der Qualitätskontrolle von QIAGEN wird jede Kit-Charge vor der Freigabe einer Funktionsüberprüfung unterzogen. Mischen Sie daher nicht Reagenzien verschiedener Kit-Chargen miteinander und kombinieren Sie auch nicht einzelne Reagenzien aus unterschiedlichen Reagenzien-Chargen.

Durchführung

- 1. Pipettieren Sie 20 μ l QIAGEN Protease (QP) in ein Lyseröhrchen (LT).**

i Überprüfen Sie vor Gebrauch das Verfallsdatum der gelösten Protease.

- 2. Geben Sie 200 μ l Blutprobe in ein Lyseröhrchen (LT).**
- 3. Pipettieren Sie 200 μ l Lysepuffer (AL) hinzu, verschließen Sie den Deckel und mischen Sie durch Schütteln für 15 Sekunden auf einem Vortex-Mischer.**

Um eine effiziente Lyse sicherzustellen, ist es besonders wichtig, Probe und Lysepuffer (AL) sofort und gründlich zu mischen, bis eine homogene Lösung vorliegt.

i Achten Sie wegen der hohen Viskosität des Lysepuffers (AL) besonders auf eine korrekte Dosierung des Lysepuffers (AL), indem Sie sorgfältig pipetieren oder eine entsprechend geeignete Pipette verwenden.

i Geben Sie die QIAGEN Protease (QP) nicht direkt in den Lysepuffer (AL).

- 4. Inkubieren Sie für 10 Minuten (± 1 Minute) bei 56 °C (± 1 °C).**
- 5. Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) kurz (ca. 5 Sekunden) bei maximaler Drehzahl, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**
- 6. Geben Sie 200 μ l Ethanol (96–100 %) in das Lyseröhrchen (LT), schließen Sie den Deckel und mischen Sie gründlich für ≥ 15 Sekunden auf einem Vortex-Laborschüttler.**
- 7. Zentrifugieren Sie das Lyseröhrchen (LT) kurz (ca. 5 Sekunden) bei maximaler Drehzahl, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**
- 8. Geben Sie das gesamte Lysat aus Schritt 7 vorsichtig – ohne den oberen Rand zu benetzen – in die QIAamp Mini-Spinsäule. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.**

i Bei der gleichzeitigen Verarbeitung mehrerer Proben empfehlen wir, immer nur ein Lyseröhrchen (LT) zu öffnen.

- 9. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei ca. 6000 x g. Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT) und werfen Sie das benutzte Röhrchen mitsamt Filtrat.**

i Falls das Lysat nach der Zentrifugation bei 6000 x g (8000 UpM) die Membran nicht vollständig passiert hat, zentrifugieren Sie noch einmal für 1 Minute bei maximaler Drehzahl (bis zu 20.800 x g).

i Sollte das Lysat nach dieser erneuten Zentrifugation immer noch nicht die Membran passiert haben, werfen Sie die Probe und wiederholen Sie das Isolierungs- und Reinigungsprotokoll mit einer neuen Probe beginnend bei Schritt 1 auf Seite 23.

- 10. Öffnen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule vorsichtig und geben Sie 500 μ l Waschpuffer 1 (AW1) hinein, ohne den oberen Rand zu**

benetzen. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.

11. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei ca. 6000 x g. Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT) und werfen Sie das benutzte Röhrchen mitsamt Filtrat.
12. Öffnen Sie die QIAamp Mini-Spinsäule vorsichtig und geben Sie 500 µl Waschpuffer 2 (AW2) hinein, ohne den oberen Rand zu benetzen. Vermeiden Sie es, die Membran in der QIAamp Mini-Spinsäule mit der Pipettenspitze zu berühren.
13. Schließen Sie den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei maximaler Drehzahl (ca. 20.000 x g bzw. 14.000 UpM). Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Waschröhrchen (WT) und werfen Sie das benutzte Röhrchen mitsamt Filtrat.
14. Zentrifugieren Sie für 3 Minuten bei maximaler Drehzahl (ca. 20.000 x g bzw. 14.000 UpM), um die Membran vollständig zu trocknen.

 Das Auslassen des Zentrifugationsschritts zur Trocknung der Membran kann zu einer Beeinträchtigung des nachfolgenden Tests führen.

15. Setzen Sie anschließend die QIAamp Mini-Spinsäule in ein sauberes Elutionsröhrchen (ET) und werfen Sie das benutzte Waschröhrchen (WT) mitsamt Filtrat. Öffnen Sie vorsichtig den Deckel der QIAamp Mini-Spinsäule und tragen Sie 50 bis 200 µl Elutionspuffer (AE) auf die Mitte der Membran auf. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie für 1 Minute bei Raumtemperatur (15–25 °C). Zentrifugieren Sie für 1 Minute bei ca. 6000 x g (8000 UpM), um die DNA zu eluieren.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge des QIAamp DSP DNA Blood Mini Kits nach festgelegten Prüfkriterien getestet, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Anwendungseinschränkungen

Die Leistungsfähigkeit des Systems bei der Isolierung genomischer DNA wurde unter Verwendung von Vollblut als Ausgangsmaterial ermittelt.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Leistungscharakteristik des Systems für jede laboreigene Methode, die nicht durch die QIAGEN-Untersuchungen zur Leistungsevaluierung nicht abgedeckt ist, selbst zu validieren.

Um das Risiko einer negativen Auswirkung auf die Ergebnisse der diagnostischen Tests zu minimieren, sollten bei der Nukleinsäure-Reinigung und in den anschließend durchgeführten Nachweisreaktionen geeignete Kontrollen mitgeführt werden. Für weitere Validierungen werden die Richtlinien der International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) empfohlen (in: *ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology*).

Alle mit dem System erhaltenen diagnostischen Ergebnisse sollten nur im Zusammenhang mit anderen klinischen und/oder labormedizinischen Untersuchungsergebnissen interpretiert werden.

Leistungscharakteristik

Ausbeute an gereinigter DNA

Der lineare Bereich der DNA-Ausbeute, die beim Vakuum-Protokoll mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit erhalten wird, wurde mit Blut gesunder Spender mit einer Leukozytenzahl von $3,8 \times 10^6$ bis $1,34 \times 10^7$ Zellen/ml bestimmt (siehe Abb. 5 auf Seite 27).

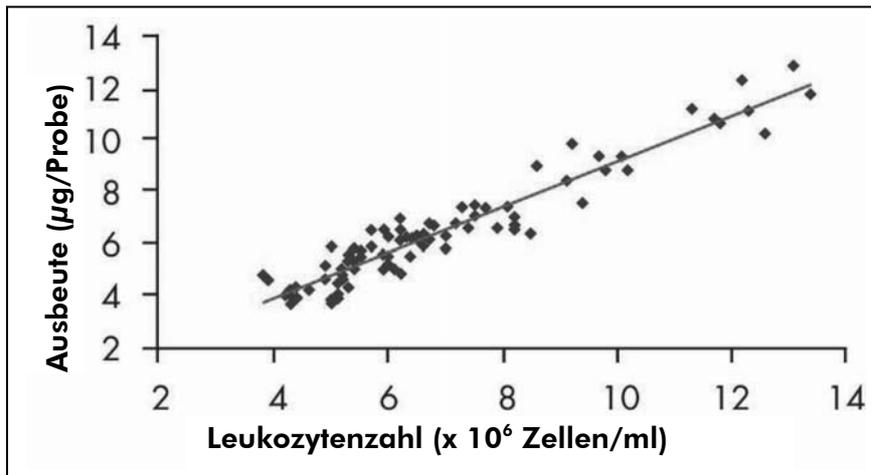


Abbildung 5. Linearer Bereich der DNA-Ausbeute bei Anwendung des Vakuum-Protokolls für den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit mit einem Elutionsvolumen von 200 µl. Die Leukozytenzahl im verwendeten Blut der gesunden Spender lag im Bereich von $3,8 \times 10^6$ bis $1,34 \times 10^7$ Zelle/ml. Die Reinigung der DNA aus den Blutproben erfolgte nach dem Vakuum-Protokoll für den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit; das verwendete Elutionsvolumen war 200 µl. Insgesamt wurden 87 Proben (jeweils in Dreifachbestimmung) verarbeitet.

Leistungsfähigkeit in nachfolgenden Tests

Die eluierte genomische DNA kann direkt in nachfolgenden Tests, u. a. in verschiedenen in-vitro-diagnostischen Assays, eingesetzt werden (siehe Tabellen 2 bis 6). Auch der Einfluss des Elutionsvolumens und des in einer PCR eingesetzten Eluatvolumens auf die Funktionalität der PCR wurden experimentell untersucht (siehe Tabelle 7).

Tabelle 2. HLA-Typisierung unter Verwendung der Dynal® AllSet+™ SSP-Assays HLA-A "Low Resolution", HLA-B "Low Resolution", DR "Low Resolution" und DQ "Low Resolution"

HLA-Locus A		HLA-Locus B		HLA-Locus DR		HLA-Locus DQ	
Genotyp	Anz.	Genotyp	Anz.	Genotyp	Anz.	Genotyp	Anz.
A2/A3	2	B51, B51/B13 oder B51/B27	1	DR1/DR3	1	DQ2	1
A3/A1	1	B13/B35	1	DR3 oder DR3/DR13	1	DQ2/DQ3	2
A3/A25	1	B8/B27	1	DR3/DR7	1	DQ6	1
A2/A24	2	B7/B13 oder 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	Andere	0	DR4	1	DQ3/DQ6	2
Andere	0			DR15	1	Andere	0
				DR1/DR7	1		
				Andere	0		

Für die Reinigung genomischer DNA mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wurden 200- μ l-Proben Vollblut, das von zufällig ausgewählten Spendern entnommen worden war, verwendet. Mithilfe der Dynal AllSet+™ SSP-Assays (von Dynal Biotech) wurden die jeweiligen Allele an den angegebenen Loci bei der genannten Anzahl an Probanden identifiziert. **Anz.:** Anzahl Probanden.

Tabelle 3. Faktor-V-Leiden-(FV-)Genotypisierung mithilfe des LightCycler® Factor V Leiden Mutation Detection Kits

Genotyp	Anzahl
Wildtyp	17
FV G16191 A heterozygot	13
FV G16191 A homozygot	0

Für die Reinigung genomischer DNA mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wurden 200- μ l-Proben Vollblut, das von 30 Spendern entnommen worden war, verwendet. Der Allelstatus beim Locus FV G1691 A wurde mithilfe des LightCycler Factor V Leiden Mutation Detection Kits (Roche Gruppe) bestimmt.

Tabelle 4. Faktor-V-Leiden-(FV-)Genotypisierung durch Endpunkt-PCR- und Pyrosequencing® Analyse mit dem PSQ-96 SNP-Reagenzien-Kit auf dem Pyrosequencing PSQ 96MA

Genotyp	Anzahl
Wildtyp	17
FV G16191 A heterozygot	13
FV G16191 A homozygot	0

Für die Reinigung genomischer DNA mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wurden 200- μ l-Proben Vollblut, das von 30 Spendern entnommen worden war, verwendet. Der Allelstatus beim Locus FV G1691 A wurde mittels Endpunkt-PCR- und Pyrosequenzierungs-Analyse mit dem PSQ-96 SNP-Reagenzien-Kit auf dem Pyrosequencing PSQ 96MA (Biotage) bestimmt.

Tabelle 5. Prothrombin-(PT-)Genotypisierung mittels Endpunkt-PCR- und Pyrosequencing-Analyse mit dem PSQ-Q96 SNP-Reagenzien-Kit auf dem Pyrosequencing PSQ 96MA

Genotyp	Anzahl
Wildtyp	30
PT G20210A heterozygot	0
PT G20210A homozygot	0

Für die Reinigung genomischer DNA mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wurden 200- μ l-Proben Vollblut, das von 30 Spendern entnommen worden war, verwendet. Der Allelstatus beim Locus PT G20210A wurde mittels Endpunkt-PCR- und Pyrosequenzierungs-Analyse mit dem PSQ-96 SNP-Reagenzien-Kit auf dem Pyrosequencing PSQ 96MA (Biotage) bestimmt.

Tabelle 6. Analyse der ApoE-Polymorphismen T112C und C158T mittels Endpunkt-PCR und Sequenzierung des Amplikons mit dem BigDye™ v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit sowie Auftrennung auf dem ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer

Genotyp	Anzahl
ApoE*3/*3	5
ApoE*3/*4	5
Andere	0

Für die Reinigung genomischer DNA mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit wurden 200- μ l-Proben Vollblut, das von 10 Spendern entnommen worden war, verwendet. Die Analyse der ApoE-Polymorphismen T112C und C158T erfolgte mittels Endpunkt-PCR und Sequenzierung des Amplikons unter Verwendung des BigDye™ v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kits sowie Auftrennung auf dem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies Corporation).

Tabelle 7. Einfluss des Elutionsvolumens und des in einer PCR eingesetzten Eluatvolumens auf die Funktionalität der PCR

Elutionsvolumen	Eluatvolumen pro 50- μ l-PCR*		
	2 μ l	5 μ l	10 μ l
50 μ l	100 %	100 %	100 %
100 μ l	100 %	100 %	97 %
200 μ l	100 %	100 %	100 %

* Die Werte geben die Trefferrate in der PCR an und repräsentieren den Mittelwert aus 48 Proben.

DNA-Stabilität im Eluat

In Haltbarkeitsuntersuchungen mit DNA-Eluaten, die mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit, einem für den allgemeinen Laborgebrauch bestimmten Testkit mit derselben Technologie, gewonnen wurden, war die mit Puffer AE von den QIAamp Mini-Spinsäulen eluierte DNA acht Jahre stabil, sowohl bei Lagerung bei 5 °C als auch bei -20 °C (siehe Abb. 6). Die Langzeituntersuchungen zur Stabilität der mit dem QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit gewonnenen DNA-Eluate dauern derzeit noch an.

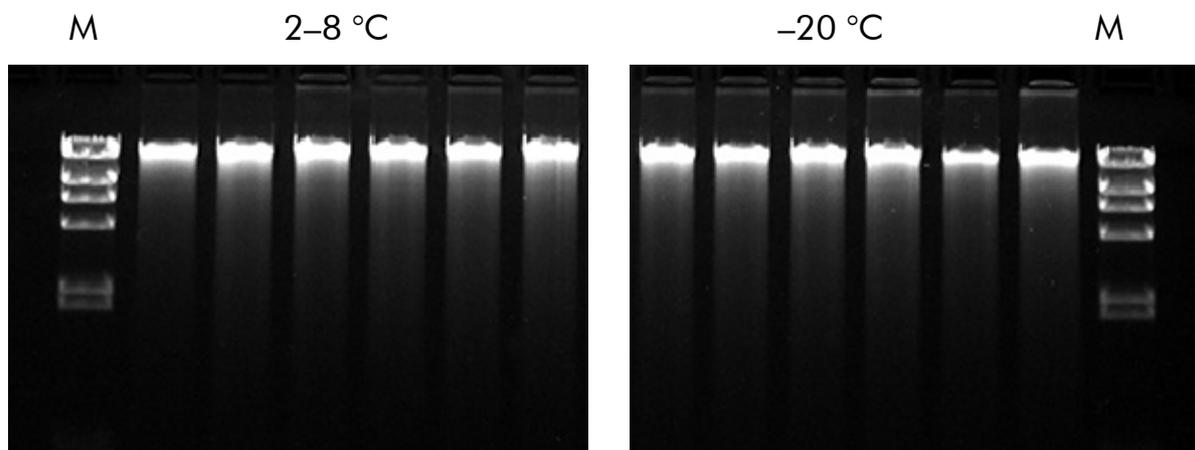


Abbildung 6. Langzeitstabilität von DNA, die mit QIAamp Mini-Spinsäulen isoliert und gereinigt wurde. Die DNA wurde mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit gereinigt, mit 200 μ l Puffer AE eluiert und entweder bei 2–8 °C oder bei -20 °C für acht Jahre aufbewahrt. Die DNA-Proben wurden in einem mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel analysiert.
M: Marker.

Symbole



Kit enthält Reagenzien für die Verarbeitung von <N> Proben



Zur Verwendung bis



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Nach Lieferung



Bei Lieferung öffnen; QIAamp Mini-Spinsäulen bei 2–8 °C lagern



Katalognummer



Chargennummer



Materialnummer



Komponenten



Enthält



Anzahl



Volumen



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Nach Ethanol-Zugabe zur Flasche aktuelles Datum aufschreiben



Zugeben

LYOPH	Lyophilisiert
RCNS	Rekonstituieren in
EtOH	Ethanol
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
SUBT	Subtilisin
➔	Führt zu
	Beachten Sie die Anwendungshinweise
	Wichtiger Hinweis

Literaturhinweis

QIAGEN unterhält eine umfangreiche, regelmäßig aktualisierte Online-Datenbank mit wissenschaftlichen Publikationen, in denen QIAGEN Produkte verwendet werden. Mehrere Suchoptionen ermöglichen es Ihnen, die Artikel zu finden, die Sie brauchen – entweder mit der einfachen Suche nach Stichwörtern oder durch Eingabe der Applikation, des Forschungsgebiets, des Titels etc.

Eine vollständige Liste der Referenzen finden Sie online in der QIAGEN Referenz-Datenbank unter www.qiagen.com/RefDB/search.asp. Sie können sich auch an den Technischen Service von QIAGEN wenden, um sie anzufordern.

Kontaktinformationen

Der Technische Service von QIAGEN garantiert Qualität auch in der wissenschaftlichen Beratung unserer Kunden. Hier stehen Ihnen erfahrene Wissenschaftler für Ihre Fragen zu Probenvorbereitungs- und Testtechnologien sowie zur Anwendung der QIAGEN Produkte gerne zur Verfügung. Rufen Sie uns an, wenn Sie Fragen zum QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit oder zu anderen QIAGEN Produkten haben.

Die Erfahrungen unserer Kunden sind eine wichtige Informationsquelle bei der Entwicklung und Verbesserung unserer Produkte. Rufen Sie uns an, denn Ihre Vorschläge und Ideen zu unseren Produkten und zu neuen Techniken interessieren uns.

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support Center unter www.qiagen.com/support. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

QIAGEN GmbH, QIAGEN-Straße 1, D-40724 Hilden, Deutschland

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: QIAamp Mini-Spinsäulen, VacConnectors (Luerverbinder), QIAGEN Protease, Reagenzien, Puffer und Auffanggefäße (Collection Tubes)	61104
Zubehör		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Vakuumkammer für die Verarbeitung von 1–24 Proben in Spinsäulen: QIAvac 24 Plus Vakuumkammer, Luer-Stopfen, Schnellkupplungen	19413
Vacuum Pump*	Universal-Vakuumpumpe	84020

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. QIAGEN Kit- und Geräte-Handbücher stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können Sie vom QIAGEN Technischen Service oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor anfordern.

* Zum Gebrauch bei Vakuum-Protokollen.

Diese Seite wurde absichtlich leer gelassen

Warenzeichen/Markenamen: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, artus®, Pyrosequencing® (QIAGEN Gruppe); ABI PRISM®, BigDye™ (Life Technologies Corporation); BD™, Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Bio-One®, Vacuette® (Greiner Bio-One); Dynal®, AllSet+™ (Dynal Biotech); Eppendorf® (Eppendorf AG); LightCycler® (Roche Gruppe); Monovette®, Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.). Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in diesem Handbuch verwendeten Markenamen oder Warenzeichen ungeschützt sind, auch wenn sie nicht als Markenname oder Warenzeichen gekennzeichnet sind.

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für den QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den Angaben in den Protokollen und in diesem Handbuch zu diesem Produkt und ausschließlich mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu diesem Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu diesem Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der in den mitgelieferten Protokollen, in diesem Handbuch und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von Anwendern von QIAGEN Produkten für andere Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Anwender-Protokolle wurden von QIAGEN weder gründlich getestet noch optimiert. QIAGEN übernimmt für sie keinerlei Garantie; auch nicht dafür, dass dadurch die Rechte Dritter nicht verletzt werden.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter www.qiagen.com nachgelesen werden.

© 2012 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

www.qiagen.com

Australia ■ techservice-au@qiagen.com

Austria ■ techservice-at@qiagen.com

Belgium ■ techservice-bnl@qiagen.com

Brazil ■ suportetecnico.brasil@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

