

QIAamp DSP Virus Spin Kit håndbok



Versjon 1



Til in vitro-diagnostisk bruk



61704



1062686NO



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

TYSKLAND

R6



1062686NO



QIAGEN Prøve- og analyseteknologi

QIAGEN er den ledende leverandøren av innovativ prøve- og analyseteknologi ved å gjøre det mulig å isolere og påvise innhold i enhver biologisk prøve. Våre avanserte høykvalitetsprodukter og tjenester sikrer suksessen fra prøve til resultat.

QIAGEN setter standardene i:

- Rensing av DNA, RNA og proteiner
- Nukleinsyre- og proteinanalyser
- microRNA-forskning og RNAi
- Automatisering av prøve- og analyseteknologi

Vårt mål er å gjøre det mulig for deg å oppnå enestående suksess og gjennombrudd. For mer informasjon besøk www.qiagen.com.

Innhold

| | |
|---|-----------|
| Tilsiktet bruk | 4 |
| Sammendrag og forklaring | 4 |
| Prinsippene for prosedyren | 4 |
| Automatisert virusnukleinsyrerensing på QIAcube | 4 |
| Medfølgende materialer | 9 |
| Settets innhold | 9 |
| Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger | 10 |
| Advarsler og forholdsregler | 11 |
| Lagring og håndtering av reagensen | 13 |
| Oppbevaring og håndtering av prøver | 13 |
| Prosedyre | 14 |
| Viktige poeng før du starter | 14 |
| Håndtering av QIAamp MinElute-søyler | 14 |
| Sentrifugering | 15 |
| Behandling av QIAamp MinElute-søyler i en mikrosentrifuge | 15 |
| Klargjøre reagenser og bufre | 15 |
| Protokoll: Rensing av virusnukleinsyrer fra plasma eller serum | 19 |
| Kvalitetskontroll | 22 |
| Begrensninger | 22 |
| Ytelsesegenskaper | 22 |
| Henvisninger | 22 |
| Symboler | 23 |
| Kontaktinformasjon | 24 |
| Vedlegg | 25 |

Tilsiktet bruk

QIAamp DSP Virus Spin Kit er et system som bruker en silica-membran-teknologi (QIAamp-teknologi) for isolasjon og rensing av virusnukleinsyrer fra biologiske prøver.

Produktet er beregnet til bruk av profesjonelle brukere, slik som teknikere og fysikere som er opplært i molekylær-biologiske teknikker.

QIAamp DSP Virus Spin Kit er beregnet til in vitro-diagnostisk bruk.

Sammendrag og forklaring

QIAamp DSP Virus Spin Kit bruker veletablert teknologi for simultan rensing av virus-DNA og -RNA. Settet kombinerer de selektive bindeegenskapene til en silica-basert membran med fleksible elusjonsvolumer på mellom 20 μ l og 150 μ l. Prosedyren egner seg til bruk med plasma og serum. Prøvene kan enten være ferske eller frosne, gitt at de ikke har vært frosset og tinet opp mer enn én gang (se side 13). Virusnukleinsyrer eluteres i Buffer AVE, klar til bruk i amplifiseringsreaksjoner eller lagring ved -25°C til -15°C .

Prinsippene for prosedyren

QIAamp DSP Virus Spin-prosedyren består av 4 trinn (lyser, binde, vaske og eluere) og utføres ved bruk av QIAamp MinElute[®]-kolonner i en standard mikrosentrifuge eller helautomatisert på QIAcube[®]. Prosedyren er utformet for å minimere potensialet for krysskontaminering fra prøve til prøve og gjør det mulig med sikker håndtering av potensielt smittefarlige prøver. Den enkle QIAamp DSP Virus Spin-prosedyren egner seg til samtidig behandling av flere prøver. QIAamp DSP Virus Spin Kit kan brukes for isolasjon av virus-RNA og -DNA fra en bred rekke RNA- og DNA-viruser. Men ytelsesegenskapene til hver virusart har ikke blitt fastsatt og må valideres av brukeren.

Automatisert virusnukleinsyrerensning på QIAcube

Rensing av virusnukleinsyrer ved bruk av QIAamp DSP Virus Spin Kit kan helautomatiseres på QIAcube. Den innovative QIAcube bruker avansert teknologi til å behandle QIAGEN[®]-spinnsøyler, slik at det er mulig med en sømløs integrasjon av automatisert, lavproduksjons prøveklargjøring i laboratoriearbeidsflyten. Prøveklargjøring ved bruk av QIAcube følger de samme trinnene som den manuelle prosedyren (dvs. lyser, binde, vaske og eluere), slik at du kan bruke QIAamp DSP Virus Spin Kit til rensing av høykvalitets virusnukleinsyrer.

Ved automatisk behandling av QIAamp DSP Virus Spin Kit på QIAcube-instrumentet, kan instrumentet behandle færre enn 50 prøver på grunn av dødvolumer, fordampning og ekstra reagensforbruk gjennom automatisk

pipettering. QIAGEN garanterer kun 50 prøveklargjøringer ved manuell bruk av QIAamp DSP Virus Spin Kit.

For mer informasjon om den automatiserte prosedyren se det relevante protokollarket som er tilgjengelig på www.qiagen.com/MyQIAcube. Oppdaterte protokollark kan lastes ned kostnadsfritt eller fås ved å kontakte QIAGENs tekniske serviceavdeling (se side 23).



Figur 1. QIAcube.

Lyse med QIAGEN Protease

Prøver lyseres under høyst denaturerende betingelser ved økte temperaturer. Lysering utføres i tilstedeværelse av QIAGEN Protease og Buffer (AL), som sammen sikrer inaktivering av RNaser.

Adsorpsjon til QIAamp MinElute-membranen

Bindingsbetingelsene justeres ved å tilsette etanol for å gjøre det mulig med optimal binding av virus-RNA og -DNA til membranen. Lysater overføres deretter på en QIAamp MinElute-søyle, og virusnukleinsyrer adsorberes på silica-gel-membranen etter som lysatet trekkes gjennom ved sentrifugering. Salt- og pH-forhold sikrer at protein og andre kontaminanter, som kan hemme PCR og andre downstream-enzymreaksjoner, ikke beholdes på QIAamp MinElute-membranen.

De 2 ml vaskerørene (medfølger) støtter QIAamp MinElute-søylen i løpet av laste- og vasketrinnene.

Fjerne resterende kontaminanter

Nukleinsyrer holder seg bundet til membranen, mens kontaminanter vaskes effektivt bort i løpet av 3 vasketrinn. I et enkelt trinn elueres høyst rent virus-RNA- og -DNA i Buffer AVE, ekvibrert til romtemperatur.

Elusjon av rene nukleinsyrer

Elusjon utføres ved bruk av Buffer AVE. QIAamp MinElute-søyler gjør det mulig med minimale elusjonsvolumer på kun 20 μ l. Lavt elusjonsvolum fører til høykonsentrerte nukleinsyreeluat.

For downstream-applikasjoner som krever små startvolumer (f.eks. PCR- og RT-PCR-analyser), kan et mer konsentrert eluat øke analysesensitiviteten.

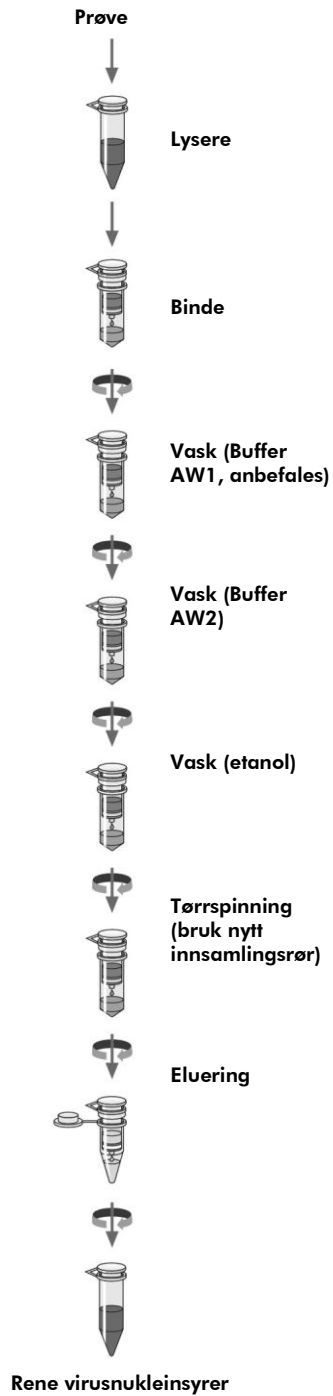
For downstream-applikasjoner som krever et større startvolum, kan elusjonsvolumet økes inntil 150 μl . Men en økning i elusjonsvolum vil redusere konsentrasjonen av nukleinsyrer i eluatet.

Eluatvolumet som gjenvinnes kan være opptil 5 μl mindre en volumet på elusjonsbufferen som ble påført søylen. For eksempel resulterer et elusjonsbuffervolum på 20 μl til > 15 μl endelig eluat. Eluatvolumet som gjenoprettes avhenger av type prøve.

Eluert nukleinsyre samles opp i 1,5 ml elusjonsrør (ET, medfølger). Det anbefales lagring av DNA eller RNA ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ytelser av virusnukleinsyre som er isolert fra biologiske prøver er normalt under 1 μg . Kvantitative amplifiseringsmetoder anbefales for å bestemme ytelse. Ved kvantifisering av isolerte nukleinsyrer ved bruk av QIAamp DSP Virus Spin-protokollen, husk på at det kommer til å være betydelig mer bærer-RNA i prøven enn virus-RNA.

QIAamp DSP Virus Spin-prosedyre



Helautomatisk på QIAcube

Bærer-RNA

Bærer-RNA har to formål. For det første øker den bindingen av virusnukleinsyrer til QIAamp-membranen, spesielt hvis det er svært få målmolekyler i prøven. For det andre reduserer tilføringen av store mengder bærer-RNA sjansen for virus-RNA-nedbrytning i det sjeldne tilfellet at RNase-molekylene ikke nedbrytes av de kaotropiske saltene og rengjøringsmiddelet i Buffer AL. Hvis bærer-RNA ikke tilføres Buffer AL, kan dette føre til redusert virus-RNA eller -DNA-gjenoppretting.

Ulike amplifiseringssystemer kan ha variert effektivitet, avhengig av den totale mengden nukleinsyre som finnes i reaksjonen. Eluater fra dette settet inneholder både virusnukleinsyrer og bærer-RNA, og mengden av bærer-RNA vil være mye større enn mengden av virusnukleinsyrer. Kalkuleringer på hvor mye eluat som skal tilsettes downstream-applikasjoner, skal derfor være basert på mengden av bærer-RNA som er tilsatt. For å oppnå de høyeste sensitivitetsnivåene i amplifiseringsreaksjoner kan det være nødvendig å justere mengden bærer-RNA som tilsettes Buffer AL.


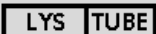










Tillegg av interne kontroller

Bruk av QIAamp DSP Virus Spin-protokollen i kombinasjon med kommersielt tilgjengelige amplifiseringsystemer kan kreve innføring av en intern kontroll i renseprosedyren. Intern kontroll-RNA eller -DNA skal tilsettes lysesbufferen sammen med bærer-RNA. For optimal renseeffektivitet skal interne kontrollmolekyler ikke være lenger enn 200 nukleotider, da mindre molekyler ikke gjenoprettes på effektiv måte.

Se produsentens instruksjoner for å kunne bestemme optimal konsentrasjon. Ved bruk av en annen konsentrasjon enn den som anbefales, kan redusere amplifiseringseffektiviteten.

Medfølgende materialer

Settets innhold

| QIAamp DSP Virus Spin Kit | | | |
|----------------------------------|---|--|-----------------------|
| Katalognr. | | | 61704 |
| Antall klargjøringer | | | 50[§] |
| QIAamp MinElute | QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (QIAamp MinElute-søyler med vaskerør) (2 ml) |  | 50 |
| LT | Lysis Tubes (Lysisrør) (2 ml) |  | 50 |
| ET | Elution Tubes (Elusjonsrør) (1,5 ml) |  | 50 |
| WT | Wash Tubes (Vaskerør) (2 ml) |  | 5 x 50 |
| AL | Lysis Buffer* (Lyseringsbuffer) |  | 33 ml |
| AW1 | Wash Buffer 1* (concentrate) (Vaskebuffer 1 [konsentrat]) |  | 19 ml |
| AW2 | Wash Buffer 2† (concentrate) (Vaskebuffer 2 [konsentrat]) |  | 13 ml |
| AVE | Elution Buffer† (purple caps) (Elusjonsbuffer [lilla lokk]) |  | 4 x 2 ml |
| PS | Protease Solvent† (Proteaseløsning) |  | 4,4 ml |
| Carrier | Carrier RNA (red caps) (Bærer-RNA [røde lokk]) |  | 310 µg |
| QP | QIAGEN Protease‡ |  | 1 vial |
| | Håndbok |  | 1 |

* Inneholder et kaotropisk salt. Ta rimelige forholdsregler og bruk hansker ved håndtering. Ikke kompatibel med desinfiseringsmidler som inneholder blekemiddel. Mer informasjon finnes i på side 11.

† Inneholder natriumazid som konserveringsmiddel.

‡ Se "Klargjøre reagenser og bufre", side 15.

§ Ved automatisk behandling av QIAamp DSP Virus Spin Kit på QIAcube-instrumentet, kan instrumentet behandle færre enn 50 prøver på grunn av dødvolumer, fordampning og ekstra reagensforbruk gjennom automatisk pipettering. QIAGEN garanterer kun 50 prøveklargjøringer ved manuell bruk av QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Materialer som er nødvendige, men som ikke medfølger

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se gjeldende sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene) som fås fra leverandøren av produktet.

- Etanol (96–100 %)*
- Pipetter[†] og pipettspisser (for å unngå krysskontamnering anbefaler vi sterkt å benytte pipettspisser med aerosolbarrierer)
- Oppvarmingsblokk[†] for lysering av prøver ved 56 °C
- Mikrosentrifuge[†] (med rotor for 1,5 ml og 2 ml rør)
- Rotator
- For prøver <200 µl: 0,9 % NaCl-løsning

* Ikke bruk denaturert alkohol, da denne inneholder andre stoffer, slik som metanol eller metyletylenketon.

[†] For å sikre at prøvene behandles tilstrekkelig i QIAamp DSP Virus Spin Kit-prosedyren, anbefaler vi på det sterkeste at instrumenter (f.eks. pipetter og varmeblokker) kalibreres ifølge produsentenes anbefalinger.

Advarsler og forholdsregler

Til in vitro-diagnostisk bruk

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se gjeldende sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene). Disse er tilgjengelige på nettet i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety. Her kan du finne, vise og skrive ut HMS for hvert QIAGEN-sett og settkomponent.



FORSIKTIG: IKKE tilfør blekemidler eller sure løsninger direkte til avfall som inneholder Buffer AL eller Buffer AW1.

Buffer AL og Buffer AW1 inneholder guanidinhydroklorid som kan danne sterkt reaktive forbindelser når det kombineres med blekemiddel. Hvis væske som inneholder disse bufrene søles, må det rengjøres med egnet laboratorierengjøringsmiddel og vann. Hvis væsken som søles inneholder potensielt smittefarlige stoffer, renses det berørte området først med laboratorierengjøringsmiddel og vann, deretter med 1 % (v/v) natriumhypokloritt.

Hvis bufferflaskene er ødelagte eller lekket, bruk hansker og beskyttelsesbriller når flaskene kastes for å unngå personlig skade eller skade på andre.

QIAGEN har ikke testet væskeavfall som genereres av QIAamp DSP Virus Spin-prosedyren for resterende infeksjonsmaterialer. Kontaminering av væskeavfallet med resterende infeksjonsmaterialer er svært usannsynlig, men kan ikke ekskluderes fullstendig. Derfor må væskeavfall betraktes som infeksjonsfarlig og kan håndteres og kastes etter lokale sikkerhetsforskrifter.

Følgende risiko og sikkerhetsuttrykk gjelder komponenter for QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Følgende risiko- og sikkerhetssetninger gjelder for komponenter i QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Buffer AL



Inneholder guanidinhydroklorid, maleinsyre. Advarsel! Kan være farlig ved svelging eller innånding. Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Ved vedvarende øyeirritasjon: Søk legehjelp. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

Buffer AW1



Inneholder: guanidinhydroklorid. Advarsel! Farlig ved svelging eller innånding. Irriterer huden. Gir alvorlig øyeirritasjon. Ring GIFTINFORMASJONEN eller lege hvis du føler deg uvel. Innholdet/holderen skal leveres til et godkjent avfallsanlegg. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. Benytt vernehansker/ verneklær/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

QIAGEN-protease



Contains: Subtilisin. Danger! Causes mild skin irritation. Causes serious eye damage. May cause allergy or asthma symptoms or breathing difficulties if inhaled. Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapors/ spray. Dispose of contents/ container to an approved waste disposal plant. If experiencing respiratory symptoms: Call a POISON CENTER or doctor/physician. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. IF INHALED: If breathing is difficult, remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing. Immediately call a POISON CENTER or doctor/physician. Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection. Wear respiratory protection.

Lagring og håndtering av reagensen

QIAamp MinElute-søyler skal lagres ved 2–8 °C ved ankomst.

Alle bufre kan lagres ved romtemperatur (15–25 °C).

Lyofilisert bærer-RNA kan lagres ved romtemperatur (15–25 °C) inntil utløpsdato på settets eske. Bærer-RNA kan kun løses i Buffer AVE; løst bærer-RNA skal umiddelbart tilføres Buffer AL slik som beskrevet på side 15. Denne løsningen skal klargjøres fersk og er stabil ved 2–8 °C i opptil 48 timer. Ubrukte porsjoner av bærer-RNA løst i Buffer AVE skal fryses i alikvoter ved –30 til –15 °C.

Lyofilisert QIAGEN Protease (QP) kan lagres ved romtemperatur (15–25 °C) inntil settets utløpsdato uten virkning på ytelsen.

QIAGEN Protease (QP) som er rekonstituert i proteaseløsning (PS), er stabil i inntil ett år ved lagring ved 2–8 °C, men kun inntil settets utløpsdato. Det skal unngås å holde QIAGEN Protease lagerløsning ved romtemperatur over lengre tid.

Rekonstituert vaskebuffer 1 (AW1) og rekonstituert vaskebuffer 2 (AW2) er stabile i inntil 1 år ved lagring ved romtemperatur (15–25 °C), men kun inntil utløpsdatoen på settets eske.

Oppbevaring og håndtering av prøver

Etter innsamling og sentrifugering, kan plasma eller serum oppbevares ved 2–8 °C i opptil 6 timer. For langsiktig oppbevaring anbefales frysing ved –20 °C eller –80 °C i alikvoter. Frosne plasma- eller serumprøver må ikke tines opp mer enn én gang. Gjentatte frysinger-opptininger fører til nedbrytning og presipitering av proteiner, noe som fører til reduserte virustitre og derfor reduserte avgivelser av virusnukleinsyrer. I tillegg vil kryopresipitater som er dannet under frysing-opptining tilstoppe QIAamp MinElute-membranen. Hvis kryopresipitater er synlige, kan de pelleteres ved sentrifugering ved omtrent 6800 x g i 3 minutter. Den rensede supernatanten skal fjernes og prosesseres umiddelbart uten å forstyrre pelleten.

Prosedyre

Viktige poeng før du starter

- Etter at du har mottatt settet, må du kontrollere settkomponentene for skade. Hvis blisterpakkene eller bufferflaskene er skadet, ta kontakt med QIAGENs tekniske tjenester eller den lokale distributøren. I tilfelle væskesøl, se "Advarsler og forholdsregler" (side 11). Ikke bruk settkomponenter som er skadet, da bruken av disse kan føre til dårlig settytelse.
- Bruk alltid RNase-fritt utstyr.
- Skift alltid pipettespissene ut mellom væskeoverføringer. For å minimere krysskontaminering anbefaler vi å benytte pipettespisser med aerosolbarrierer.
- Alle sentrifugeringstrinn utføres ved romtemperatur (15–25 °C).
- Bruk alltid engangshansker og kontroller regelmessig av de ikke kontamineres med prøvemateriale. Kast hanskene hvis de blir kontaminert.
- For å minimere krysskontaminering, åpne kun ett rør om gangen.
- Ikke bruk settkomponenter fra andre sett med de settene du aktuelt bruker, med mindre lotnumrene er identiske.
- Unngå mikrobiell kontaminering av settreagensene.
- For å garantere sikkerhet mot potensielt infeksjonsmateriale anbefaler vi å jobbe under laminære luftstrømningsforhold inntil prøvene er lyserte.
- Dette settet skal kun brukes av personale som er opplært i in vitro-diagnostisk laboratoriepraksis.

Håndtering av QIAamp MinElute-søylar

På grunn av sensitiviteten til nukleinsyreampliceringsteknologi, er det viktig å følge disse forholdsreglene ved håndtering av QIAamp MinElute-søylar for å unngå krysskontaminering mellom prøveklargjøringer:

- Påfør prøve eller løsningen forsiktig på QIAamp MinElute-søylen. Pipetter prøven inn i QIAamp MinElute-søylen uten å fukte kanten på søylen.
- Skift pipettespissene mellom alle væskeoverføringer. Det anbefales bruk av pipettespisser med aerosolbarriere.
- Unngå å komme i kontakt med QIAamp MinElute-membranen med pipettespissen.
- Etter alle pulsroteringstrinn sentrifuger mikrosentrifugerørene kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.

- Bruk hansker gjennom hele prosedyren. Bytt hansker straks hvis de kommer i kontakt med prøven.

Sentrifugering

- Vaskerør og elusjonsrør for alle sentrifugeringstrinn leveres sammen med settet.
- Sentrifugeringen av QIAamp MinElute-søyler utføres ved ca. 6000 x g for å kunne redusere sentrifugestøyen. Sentrifugering av QIAamp MinElute-søyler ved full hastighet vil ikke påvirke ytelsen for DNA og RNA.
- For tørrspinningen på slutten av vaskeprosedyren og for elusjonen skal sentrifugeringen utføres ved full hastighet.
- Alle sentrifugeringstrinn skal utføres ved romtemperatur (15–25 °C).

Behandling av QIAamp MinElute-søyler i en mikrosentrifuge

- Lukk QIAamp MinElute-søylen før den plasseres i mikrosentrifugen. Sentrifuger som beskrevet.
- Fjern QIAamp MinElute-søylen og vask røret fra mikrosentrifugen.
- Plasser QIAamp MinElute-søylen i et nytt vaskerør. Kast filtratet og vaskerøret. Vennligst merk at filtratet kan inneholde farlig avfall og skal avhendes på egnet måte.
- Åpne bare én QIAamp MinElute-søyle om gangen, og vær forsiktig så du unngår å generere aerosoler.

For effektiv parallell behandling av flere prøver, anbefaler vi å fylle et stativ med vaskerør, slik at QIAamp MinElute-søylene kan overføres til etter sentrifugering. Brukte vaskerør som inneholder filtratet, kan kastes, og de nye vaskerørene som inneholder QIAamp MinElute-søylene kan plasseres direkte i mikrosentrifugen.

Klargjøre reagenser og bufre

- Klargjøring av RNA

Ved klargjøring av virus-RNA jobb hurtig gjennom de manuelle trinnene i prosedyren og les vedlegget på side 25 før start.

- Klargjøre QIAGEN Protease

Tilfør hele innholdet av flasken med 4,4 ml proteaseløsning (PS) til flasken med lyofilisert QIAGEN Protease (QP), og bland forsiktig. For å unngå skumming, bland ved å vende flasken flere ganger. Se til at QIAGEN Protease (QP) er helt oppløst.

i Ikke tilfør QIAGEN Protease (QP) direkte til Buffer AL.*

QIAGEN Protease (QP) som er rekonstituert i proteaseløsning (PS), er stabil i ett år ved lagring ved 2–8 °C, men kun inntil settets utløpsdato. Det skal unngås å holde QIAGEN Protease lagerløsning ved romtemperatur over lengre tid.

■ Tilsette bærer-RNA til Buffer AL*

Tilsett 310 µl Buffer AVE til røret som inneholder 310 µg lyofilisert bærer-RNA for å oppnå en løsning på 1 µg/µl. Løs opp bærer-RNA grundig, del det i alikvoter i passende størrelse, og lagre det ved –25 °C til –15 °C. Ikke frys-tin alikvoter med bærer-RNA mer enn 3 ganger.

i Bærer-RNA løses ikke opp i Buffer AL. Det må først løses i Buffer AVE og deretter legges til Buffer AL.

Kalkuler volumet på Buffer AL–bærer-RNA-blandingen som er nødvendig pr. prøveomgang ved å velge antall prøver som skal behandles samtidig fra tabell 1, side 17. For større antall prøver, kan volumene kalkuleres ved bruk av prøve kalkuleringen nedenfor:

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

$$y \text{ ml} \times 28 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

der: **n** = antall prøver som skal behandles samtidig

y = kalkulert volum av Buffer AL

z = volum av bærer-RNA–Buffer AVE som skal tilsettes Buffer AL

Bland forsiktig ved å vende røret forsiktig 10 ganger. For å unngå skumming, ikke utfør vorteks.

* Inneholder et kaotropisk salt. Ta rimelige laboratorieforholdsregler og bruk hansker ved håndtering. Ikke kompatibel med desinfiseringsmidler som inneholder blekemiddel. Se side 11 for sikkerhetsinformasjon.

Tabell 1. Volum (Vol.) av Buffer AL og bærer-RNA-Buffer AVE-blandingen som er nødvendig for spesifikke numre (nr.) av prøver for QIAamp DSP Virus Spin-prosedyren

| Ant. prøver | Vol. Buffer AL (ml) | Vol. bærer-RNA-AVE (μ l) | Ant. prøver | Vol. Buffer AL (ml) | Vol. bærer-RNA-AVE (μ l) |
|-------------|---------------------|-------------------------------|-------------|---------------------|-------------------------------|
| 1 | 0,22 ml | 6,2 μ l | 13 | 2,86 ml | 80,1 μ l |
| 2 | 0,44 ml | 12,3 μ l | 14 | 3,08 ml | 86,3 μ l |
| 3 | 0,66 ml | 18,5 μ l | 14 | 3,30 ml | 92,4 μ l |
| 4 | 0,88 ml | 24,6 μ l | 16 | 3,52 ml | 98,6 μ l |
| 5 | 1,10 ml | 30,8 μ l | 17 | 3,74 ml | 104,7 μ l |
| 6 | 1,32 ml | 37,0 μ l | 18 | 3,96 ml | 110,9 μ l |
| 7 | 1,54 ml | 43,1 μ l | 19 | 4,18 ml | 117,0 μ l |
| 8 | 1,76 ml | 49,3 μ l | 20 | 4,40 ml | 123,2 μ l |
| 9 | 1,98 ml | 55,4 μ l | 21 | 4,62 ml | 129,4 μ l |
| 10 | 2,20 ml | 61,6 μ l | 22 | 4,84 ml | 135,5 μ l |
| 11 | 2,42 ml | 67,8 μ l | 23 | 5,06 ml | 141,7 μ l |
| 12 | 2,64 ml | 73,9 μ l | 24 | 5,28 ml | 147,8 μ l |

i Prøveklargjøringsprosedyren er optimalisert for 5,6 μ g bærer-RNA per prøve. Hvis mindre bærer-RNA har vist seg å være bedre for amplifiseringssystemet, overfør kun den nødvendige mengden av oppløst bærer-RNA til rørene som inneholder Buffer AL. For hvert mikrogram bærer-RNA som er nødvendig per klargjøring, tilsett 5 μ l Buffer AVE-oppløst bærer-RNA per milliliter Buffer AL. Bruk av mindre enn 5,6 μ g bærer-RNA per prøve må valideres for hver bestemte prøvetype og downstream-analyse.


Buffer AW1*

Tilsett 25 ml etanol (96–100 %) til en flaske som inneholder 19 ml Buffer AW1-konsentrat, slik som beskrevet på flasken. Merk av avkryssingsruten på merket for å indikere at det er tilsatt etanol. Lagre den rekonstituerte Buffer AW1 ved romtemperatur (15–25 °C). Rekonstituert Buffer AW1 er stabil i inntil ett år ved lagring ved romtemperatur, men kun inntil settets utløpsdato.

 Bland alltid den rekonstituerte Buffer AW1 ved å riste før start av prosedyren.

Buffer AW2†

Tilsett 30 ml etanol (96–100 %) til en flaske som inneholder 13 ml Buffer AW2-konsentrat, slik som beskrevet på flasken. Merk av avkryssingsruten på merket for å indikere at det er tilsatt etanol. Lagre den rekonstituerte Buffer AW2 ved romtemperatur (15–25 °C). Rekonstituert Buffer AW2 er stabil i inntil ett år ved lagring ved romtemperatur, men kun inntil settets utløpsdato.

 Bland alltid den rekonstituerte Buffer AW2 ved å riste før start av prosedyren.

Elusjon av nukleinsyrer

Elusjonsbuffer skal ekvilibreres til romtemperatur før den påføres søylen.

* Inneholder et kaotropisk salt. Ta rimelige laboratorieforholdsregler og bruk hansker ved håndtering. Ikke kompatibel med desinfiseringsmidler som inneholder blekemiddel. Se side 11 for sikkerhetsinformasjon.

† Inneholder natriumazid som preserveringsmiddel.

Protokoll: Rensing av virusnukleinsyrer fra plasma eller serum

Denne protokollen er for rensing av virusnukleinsyrer fra 200 μ l plasma eller serum ved bruk av QIAamp DSP Virus Spin Kit og en mikrosentrifuge. For automatisert rensing bruk QIAamp DSP Virus Spin Kit med QIAcube se Brukerhåndboken for QIAcube (*QIAcube User Manual*) og det relevante protokollarket.

Viktige poeng før du starter


- Alle sentrifugeringstrinn utføres ved romtemperatur (15–25 °C).

Ting du skal gjøre før du starter

- Ekvilibrer prøver til romtemperatur (15–25 °C).
- Ekvilibrer Buffer AVE til romtemperatur for elusjon i trinn 14.
- Still inn en varmeblokk til 56 °C \pm 3 °C for bruk i trinn 4.
- Se til at Buffer AW1, Buffer AW2 og QIAGEN Protease (QP) har blitt klargjort etter instruksjonene på side 15–18.
- Tilsett bærer-RNA konstituert i Buffer AVE til Buffer AL følge instruksjoner på side 15.

Prosedyre

1. Pipette 25 μ l QIAGEN Protease (QP) til et lyseringsrør (LT).

 Les "Klargjøre reagenser og bufre", side 15, for informasjon om resuspending av QIAGEN Protease (QP) i Protease Solvent (PS).

2. Tilfør 200 μ l plasma eller serum til lyseringsrøret (LT).

Hvis prøvevolumet er mindre enn 200 μ l, tilsett passende volum av 0,9 % natriumkloridløsning for å bringe volumet på proteasen og prøven til en totalmasse på 225 μ l.

3. Tilsett 200 μ l Buffer AL (som inneholder 28 μ g/ml bærer-RNA). Lukk lokket og bland ved å utføre puls-vortex i \geq 15 sekunder.

For å sikre effektiv lysering, er det avgjørende at prøven og Buffer AL blandes grundig for å fremskaffe en homogen løsning.

 Ikke tilfør QIAGEN Protease (QP) direkte til Buffer AL.

4. Inkuber ved 56 °C \pm 3 °C i 15 minutter \pm 1 minutt i en varmeblokk.

5. Sentrifuger lyseringsrøret (LT) kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.

6. Tilsett 250 µl etanol (96–100 %) til prøven, lukk lokket og bland grundig med puls-vortex i ≥ 15 sekunder. Inkuber lysatet med etanolen i 5 minutter ± 30 sekunder ved romtemperatur (15–25 °C).



Hvis omgivelsestemperaturen overskrider 25 °C, skal etanol nedkjøles på is før tilsetning til lysatet.

7. Sentrifuger røret kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.
8. Påfør forsiktig hele lysatet fra trinn 7 til QIAamp MinElute-søylen uten at kanten blir våt. Lukk hetten og sentrifuger ved omtrent 6000 x g i > 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-søylen i et rent 2 ml vaskerør (WT) og kast vaskerøret som inneholder filtratet.

Hvis lysatet ikke har passert helt gjennom søylen etter sentrifugeringen, sentrifuger igjen ved høyere hastighet inntil QIAamp MinElute-søylen er tom.

9. Åpne forsiktig QIAamp MinElute-søylen og tilsett 500 µl Buffer AW1 uten å gjøre kanten våt. Lukk hetten og sentrifuger ved omtrent 6000 x g i ≥ 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-søylen i et rent 2 ml vaskerør (WT) og kast vaskerøret som inneholder filtratet.
10. Åpne forsiktig QIAamp MinElute-søylen og tilsett 500 µl Buffer AW2 uten å gjøre kanten våt. Lukk hetten og sentrifuger ved omtrent 6000 x g i > 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-søylen i et rent 2 ml vaskerør og kast vaskerøret som inneholder filtratet.
11. Åpne forsiktig QIAamp MinElute-søylen og tilsett 500 µl etanol (96–100 %) uten å gjøre kanten våt. Lukk hetten og sentrifuger ved omtrent 6000 x g i > 1 minutt. Kast vaskerøret som inneholder filtratet.

Etanoloverføring til eluatet kan forårsake problemer i downstream-applikasjoner. Noen sentrifugerotorer kan vibrere ved deselerasjon, som fører til gjennomstrømning, som inneholder etanol som kommer i kontakt med QIAamp MinElute-søylen. Fjerning av QIAamp MinElute-søylen og vaskerøret fra rotoren kan også føre til at gjennomstrømning kommer i kontakt med QIAamp MinElute-søylen.

12. Plasser QIAamp MinElute-søylen i et rent 2 ml vaskerør (WT). Sentrifuger ved full hastighet (ca. 20 000 x g) i 3 minutter ± 30 sekunder for å tørke membranen fullstendig.
13. Plasser QIAamp MinElute-søylen i et nytt 2 ml vaskerør (WT), åpne lokket og inkuber enheten ved 56 °C ± 3 °C i 3 minutter ± 30 sekunder for å tørke membranen fullstendig.

Dette trinnet tjener til å fordampe all resterende væske.

14. Plasser QIAamp MinElute-søylen i et elusjonsrør (ET) og kast vaskerøret med filtratet. Åpne forsiktig lokket på QIAamp MinElute-søylen og påfør 20 til 150 µl Buffer AVE på midten av membranen.

Lukk lokket og inkuber ved romtemperatur i 5 minutter. Sentrifuger ved full hastighet (omtrent 20 000 x g) i >1 minutt.



Sikre at elusjonsbufferen ekvilibrerer til romtemperatur. Hvis elusjonen utføres i små volum (<50 μ l), må elusjonsbufferen dispenseres på midten av membranen for fullstendig elusjon av bundet RNA og DNA.

Elusjonsvolumet er fleksibelt og kan tilpasses ifølge kravene til downstream-applikasjonen. Husk at det gjenvunne eluatvolumet vil være omtrent 5 μ l mindre enn elusjonsbuffervolumet som påføres søylen.

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med QIAamp DSP Virus Spin Kit mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Systemytelsen har blitt fastsatt ved bruk av plasma- og serumprøver for isolering av virusnukleinsyrer.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for andre prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGEN ytelsesstudier.

For å minimere risikoen for negativ påvirkning på de diagnostiske resultatene skal det brukes passende kontroller for downstream-applikasjoner. For ytterligere validering anbefales retningslinjene til ICH (internasjonal konferanse for harmonisering av tekniske krav) i ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Text And Methology (Validering av analytiske prosedyrer: Tekst og metodologi).

Alle diagnostiske resultater som genereres må tolkes i sammenheng med andre kliniske eller laboratoriske funn.

Ytelsesegenskaper

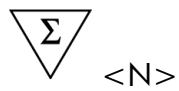
Se www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance for ytelsesegenskaper for QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Henvisninger

QIAGEN opprettholder en stor oppdatert online database med vitenskapelige kunngjøringer ved bruk av QIAGEN-produkter. Omfattende søkealternativer gjør at du kan finne de artiklene du har behov for, enten med enkelt nøkkelordsøk eller ved å spesifisere applikasjonen, forskningsområdet, tittelen osv.

For en fullstendig liste over referanser, besøk QIAGENs referansedatabase online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller ta kontakt med QIAGENs tekniske tjenester eller din lokale distributør.

Symboler



Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> prøveklargjøringer



Se bruksanvisningen



Brukes innen



In vitro-diagnostisk medisinsk enhet



Katalognumre



Viktig merknad



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Volum



Temperaturbegrensning



Produsent



Ved ankomst



Ved levering: Lagre QIAamp MinElute-søyler ved 2–8 °C



Skriv ned aktuell dato etter at du har tilsatt etanol i flasken



Tilsetting



Inneholder

| | |
|--------------------|------------------------|
| LYOPH | Lyofilisert |
| RCNS | Rekonsituer i |
| EtOH | Etanol |
| GuHCl | Guanidinhydroklorid |
| MALEIC ACID | Maleinsyre |
| SUBT | Subtilisin |
| GTIN | Globalt artikkelnummer |
| → | Fører til |

Kontaktinformasjon

Hos QIAGEN er vi stolte av kvaliteten og tilgjengeligheten av vår tekniske støtte. Våre tekniske serviceavdelinger er bemannet av erfarne vitenskapsfolk med omfattende praktisk og teoretisk ekspertise i prøve- og analyseteknologi og bruken av QIAGEN-produkter. Hvis du har noen spørsmål eller opplever vanskeligheter med QIAamp DSP Virus Spin Kit eller QIAGEN-produkter generelt sett, vennligst ikke nøl med å ta kontakt med oss.

QIAGEN-kunder er en større informasjonskilde vedrørende avansert eller spesialisert bruk av produktene våre. Denne informasjonen er nyttig for andre forskere, samt for forskerne ved QIAGEN. Vi oppmuntrer deg derfor til å ta kontakt med oss hvis du har forslag om produktets ytelse eller nye bruksområder og teknikker.

For teknisk assistanse og mer informasjon vennligst se vårt tekniske supportsenter på www.qiagen.com/Support eller ring én av QIAGENS tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller besøk www.qiagen.com).

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, Tyskland

Vedlegg

Håndtere RNA

Ribonukleaser (RNaser) er svært stabile og aktive enzymer som vanligvis ikke trenger kofaktorer for å fungere. Siden RNaser er vanskelige å inaktivere, og selv de minste mengdene er nok til å ødelegge RNA, ikke bruk plast eller glass uten først å eliminere mulig RNase-kontaminasjon. Du bør være svært nøye med å unngå at RNase utilsiktet introduseres i RNA-prøven under eller etter isolasjonsprosedyren. For å opprette og vedlikeholde et RNase-fritt miljø, må du overholde visse forholdsregler under forhåndsbehandling og bruk av engangs- og ikke-engangskar og løsninger når du jobber med RNA.

Generell håndtering

Riktig mikrobiologisk, aseptisk teknikk skal alltid brukes ved arbeid med RNA. Det er bakterier på hender og støvpartikler, og disse er de vanligste kildene til RNase-kontaminasjon. Bruk alltid lateks- eller vinylhansker ved håndtering av reagenser og RNA-prøver for å forhindre RNase-kontaminasjon fra overflaten av huden eller fra støvete laboratorieutstyr. Bytt hansker ofte og hold rørene lukket.

Plastdeler til flergangsbruk

Plastdeler til flergangsbruk skal behandles før bruk for å sikre at de er RNase-fri. Plastdeler skal skylles grundig med 0,1 M NaOH,* 1 mM EDTA* etterfulgt av RNase-fritt vann* (se "Løsninger", side 26). Alternativet kan kloroformresistente plastdeler skylles med kloroform* for å inaktivere RNaser.

Glassdeler

Glassdeler skal behandles før bruk for å sikre at de er RNase-fri. Glassdeler som brukes til RNA-arbeid skal rengjøres med rengjøringsmiddel, skylles grundig og ovnstekes ved >240 °C i fire eller flere timer (over natten, hvis det er mer praktisk) før bruk. Kun autoklaving vil ikke fullstendig inaktivere mange RNaser. Steking i ovn vil både inaktivere ribonukleaser og sikre at ingen andre nukleinsyrer (slik som plasmid-DNA) forblir på overflaten til glassdelene. Alternativt kan glassdeler behandles med DEPC* (dietylpyrokarbonat). Dekk til glassdelene med 0,1 % DEPC i vann over natten (12 timer) ved 37 °C, og autoklaver eller varm opp til 100 °C i 15 minutter for å fjerne DEPC.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se gjeldende HMS-datablad (SDS) som fås fra leverandøren av produktet.

i Corex[®]-rør skal anses RNase-fri ved behandling med DEPC og ikke ved steking. Dette vil redusere feilraten for denne typen rør i løpet av sentrifugering.

Elektroforesetanker

Elektroforesetanker skal rengjøres med rengjøringsløsning (f.eks. 0,5 % SDS),* skylles med vann, tørkes med etanol,*[†] og deretter fylles med en løsning på 3 % hydrogenperoksid*. Etter 10 minutter ved romtemperatur skal elektroforesetankene skylles grundig med RNase-fritt vann.

Løsninger

Løsninger (vann og andre løsninger) skal behandles med 0,1 % DEPC. DEPC vil reagere med primære aminer og kan ikke brukes direkte for å behandle Tris-bufre. DEPC er høyst ustabil i tilstedeværelsen av Tris-bufre og nedbrytes hurtig til etanol og CO₂. Ved klargjøring av Tris-bufre, behandle først vann med DEPC og oppløs deretter Tris for å lage passende buffer.

DEPC er en sterk, men ikke absolutt, inhibitor for RNaser. Det brukes vanligvis ved en konsentrasjon på 0,1 % for å inaktivere RNaser på glass eller plastdeler eller for å opprette RNase-fri løsninger og vann. DEPC inaktiverer RNaser ved kovalent modifisering. Spormengder av DEPC vil modifisere purine rester i RNA gjennom karbetoksylering. Karbetoksyleret RNA overføres med svært lav effektivitet i cellefri systemer. Men dets evne til å danne DNA:RNA- eller RNA:RNA-hybrider er ikke betydelig påvirket med mindre en stor andel av purinrestene har blitt modifisert. Resterende DEPC må alltid fjernes fra løsninger eller kar gjennom autoklaving eller oppvarming til 100 °C ± 3 °C i 15 minutter ± 1 minutt.

Tilsett 0,1 ml DEPC til 100 ml av løsningen som skal behandles, og rist kraftig for å bringe DEPC inn i løsningen eller la løsningen inkubere i >12 timer ved 37 °C ± 3 °C. Autoklaver i 15 minutter ± 1 minutt for å fjerne alle spor av DEPC. Det kan være ønskelig å teste vannkilder for tilstedeværelse av kontaminerende RNaser, siden mange kilder av destillert vann er fri for RNase-aktivitet.

i QIAamp DSP Virus Spin Kit-bufre er ikke gjort RNase-fri ved DEPC-behandling og er derfor fri for DEPC-kontaminering.

* Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se gjeldende HMS-datablad (SDS) som fås fra leverandøren av produktet.

[†] Plastdeler som brukes til noen elektroforesetanker er ikke resistente mot etanol. Utvis forsiktighet og kontroller leverandørens anvisninger.

Varemerker: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute® (QIAGEN Group); Corex® (Corning, Inc.).

Registrerte navn, varmerker osv. som brukes i dette dokumentet skal ikke betraktes som ubeskyttet av lov, selv om de ikke spesifikt er merket som dette.

Begrenset lisensavtale for QIAamp DSP Virus Spin Kit

Bruk av dette produktet innebærer at en kjøper eller bruker av QIAamp DSP Virus Spin Kit samtykker i følgende vilkår:

- 1 QIAamp DSP Virus Spin Kit kan brukes bare i samsvar med håndboken for *QIAamp DSP Virus Spin Kit* og til bruk med komponenter som er bare i settet. QIAGEN gir ingen lisens i forhold til noen av sine opphavsrettslige produkter til å bruke eller innlemme vedlagte komponenter i dette settet med noen komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i håndboken for *QIAamp DSP Virus Spin Kit* og flere protokoller som nå finnes på www.qiagen.com.
- 2 QIAGEN gjør ingen garantier for at denne pakken og/eller bruksområdene ikke krenker rettighetene til tredjeparter bortsett fra tydelig uttrykte lisenser.
- 3 Dette settet og komponentene i det er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
- 4 QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller antydnet, bortsett fra det som er uttrykkelig oppgjitt.
- 5 Kjøperen og brukeren av settet samtykker i å ikke la noen andre gjøre noe som kan føre til handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine forskende og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, i noen handling for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller noen av sine immaterielle rettigheter i forhold til settet og/eller komponentene.

For oppdaterte lisensvilkår se www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, alle rettigheter forbeholdt.

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

