

август 2018 г.

РЪКОВОДСТВО за набора QIAamp[®] DSP Virus



Наборът QIAamp DSP Virus е генерична система, използваща технология QIAamp за изолиране и пречистване на вирусни нуклеинови киселини от човешка плазма или серумни проби за *in vitro* диагностични процедури.

За *in vitro* диагностика

IVD

CE

REF

60704

i

1114514BG



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ

EC REP



R3 MAT

1024585

Съдържание

Съдържание на набора.....	4
Символи	5
Съхранение.....	6
Контрол на качеството	6
Предназначение	7
Ограничения при използването на продукта.....	7
Предупреждения и предпазни мерки.....	8
Въведение	10
Принцип и процедура	13
Оборудване и реагенти, които трябва да бъдат доставени от потребителя.....	16
Важни забележки.....	17
Важни забележки преди започване	17
Подготовка на РНК.....	18
Съхраняване на проби.....	18
Подготовка на реагенти и буфери	18
Елуиране на вирусни нуклеинови киселини.....	21
Добив и качество на вирусни нуклеинови киселини.....	22
Подготовка на вакуумната система QIAvac 24 Plus.....	22
Протокол: Изолиране и пречистване на вирусни нуклеинови киселини от плазма и серум	26
История на редакции.....	31

Съдържание на набора

QIAamp DSP Virus Kit				
Каталожен №				60704
Брой подготвени проби				50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Колони QIAamp MinElute с епруветки за промиване) (WT) (2 ml)	COL		50
EXT	Column Extenders (Удължители за колони) (3 ml)	COL	EXT	50
ET	Elution Tubes (Епруветки за елиране) (1,5 ml)	ELU	TUBE	50
VC	VacConnectors	VAC	CON	50
LT	Lysis Tubes (Епруветки за лизиране) (2 ml)	LYS	TUBE	50
WT	Wash Tubes (Епруветки за промиване) (2 ml)	WASH	TUBE	50
AL	Lysis Buffer (Лизиращ буфер)*	LYS	BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1 (concentrate) (Промиващ буфер 1 (концентрат))*	WASH	BUF 1 CON	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (concentrate) (Промиващ буфер 2 (концентрат))†	WASH	BUF 2 CON	13 ml
AVE	Elution Buffer (purple caps) (Елиращ буфер (лилави капачки))‡	ELU	BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent (Протеазен разтворител)†	QPROT	SOLV	4,4 ml
Носител	Carrier RNA (red caps) (Носеща РНК (CARRIER) (червени капачки))	CAR	RNA	310
QP	QIAGEN® Protease (QIAGEN® протеаза)	QPROT		1 флакон
CD				1
Ръководство				1

* Съдържа гуанидин хидрохлорид. Несъвместимо с дезинфектанти, съдържащи избелващи реагенти. Вижте страница 8 за информация за безопасността.

† Съдържа натриев азид като консервант.

‡ Обем след ресуспендиране 4,4 ml.

СИМВОЛИ



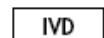
Наборът съдържа реагенти за подготовка на 50 проби



Направете справка с информацията в ръководството



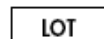
Да се използва от



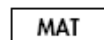
In vitro диагностично медицинско устройство



Каталожен номер



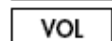
Партиден номер



Номер на материала



Компоненти



Обем



Температурни ограничения



При получаване



Законен производител



Важна забележка



Сменете ръкавиците след стъпка от протокола с този маркер



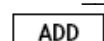
Отворено при доставка; колонии QIAamp Mini Spin при 2 – 8°C



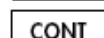
Глобален номер на търговска единица



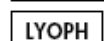
Запишете текущата дата след добавяне на етанол в бутилката



Добавяне



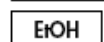
Съдържа



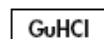
Лиофилизиран



Разтворете в



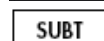
Етанол



Гуанидин хидрохлорид



Малеинова киселина



Субтилизин



Води до

Съхранение

След доставка колоните QIAamp MinElute трябва да бъдат съхранявани при температура 2 – 8°C.

Всички буфери трябва да се съхраняват при стайна температура (15 – 25°C).

До изтичане срока на годност, лиофилизираната носеща РНК (CARRIER) може да бъде съхранявана при стайна температура. Носещата РНК (CARRIER) може да бъде разтваряна само в елуиращ буфер (AVE); разтворената носеща РНК (CARRIER) трябва незабавно да бъде добавена към лизиращ буфер (AL), както е описано на страница 18. Този разтвор трябва да бъде прясно приготвен и при 2 – 8°C е стабилен до 48 часа. Неизползваните части носеща РНК (CARRIER), разтворени в елуиращ буфер (AVE) трябва да бъдат замразени в аликвотни части при -20°C.

До изтичане срока на годност, лиофилизираната QIAGEN протеаза (QP) може да бъде съхранявана при стайна температура до изтичане на срока на годност, без влошаване на свойствата.

Възстановената QIAGEN протеаза (QP) е стабилна за срок до 1 година при температура 2 – 8°C, но само преди изтичане на срока на годност.

Възстановеният промиващ буфер 1 (AW1) и възстановеният промиващ буфер 2 (AW2) са стабилни до 1 година, при съхраняване на стайна температура, но само преди изтичане на срока на годност.

Контрол на качеството

В съответствие със сертифицираната обща система за управление на качеството на QIAGEN всяка партида на набора QIAamp DSP Virus е преминала изпитание по предварително определени спецификации, за да се гарантира постоянно качество на продукта.

Предназначение

Наборът QIAamp DSP Virus е генерична система, използваща технология QIAamp за изолиране и пречистване на вирусни нуклеинови киселини от човешка плазма или серумни проби за *in vitro* диагностични цели. Всички диагностични резултати, получени чрез процедурата за подготовка на пробата, във връзка с всеки диагностичен NAT последващ анализ по веригата, трябва да бъдат интерпретирани по отношение на други клинични или лабораторни находки.

Продуктът е предназначен за употреба от професионални потребители като техници и лекари, обучени за прилагане на техники от молекулярната биология. Той е предназначен да се използва с всякакви приложения надолу по-веригата, използващи ензимно усилване или друга ензимна модификация на ДНК или РНК, последвани от детекция или усилване на сигнала. Изолираните и пречистени вирусни нуклеинови киселини могат да бъдат използвани в качествени (например, кръвен скрининг) както и количествени (например, мониториране на вирусно натоварване) диагностични NAT анализи.

За да се сведат до минимум нередностите в диагностичните резултати, през целия процес на подготовка на пробата, амплификация и детекция на пробите, съгласно използвания последващ анализ по веригата, продуктът е предназначен да се използва с вътрешен контрол, както и с положителни и отрицателни контроли.

Продуктът е предназначен да се използва с вакуумна система QIAvac 24 Plus или еквивалентна вакуумна система.

Ограничения при използването на продукта

Наборът не е предназначен да се използва с кръв, тъкани, костен мозък или култивирани клетки. Също така наборът не е предназначен за изолиране и пречистване на бактериални, гъбични или паразитни нуклеинови киселини. Не е оценена ефективността на набора при изолиране и пречистване на вирусни нуклеинови киселини от други телесни течности, които не съдържат клетки, като урина и CSF.

Предупреждения и предпазни мерки

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация, моля, направете справка със съответните информационни листове за безопасност (ИЛБ). Те са достъпни онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате ИЛБ за всеки набор QIAGEN и неговите компоненти.

ВНИМАНИЕ: Не добавяйте избелващи или кисели разтвори към отпадъците от подготовката на пробите.

Лизиращият буфер (AL) и промиваният буфер 1 (AW1) съдържат гуанидин хидрохлорид, който може да образува съединения с висока реакционна способност, когато бъде комбиниран с избелващи препарати. При разливане на течност, съдържаща тези буфери, почистете с подходящ лабораторен почистващ препарат и вода. Ако разлятата течност съдържа потенциално инфекциозни агенти, първо почистете засегнатата зона с лабораторен почистващ препарат и вода, и след това с 1% (v/v) разтвор на натриев хипохлорит.

Ако бутилките с буфери са повредени или текат, когато изхвърляте бутилките, носете ръкавици и защитни очила, за да избегнете нараняване или да не причините нараняване на други хора.

QIAGEN не е провеждал изпитване за наличие на остатъчни инфекциозни материали в отпадъчните течности, получени от процедурата QIAamp DSP Virus. Замърсяването на течните отпадъци с остатъчни инфекциозни материали е много малко вероятно, но не може да бъде изключено напълно. Поради това течните отпадъци трябва да се считат за инфекциозни и да се третират и изхвърлят в съответствие с местните разпоредби за безопасност.

Следните предупреждения за опасност и мерки за безопасност се отнасят за компонентите на набора QIAamp DSP Virus.

Буфер AL



Съдържа: гуанидин хидрохлорид; малеинова киселина. Внимание! Може да бъде опасен за здравето при поглъщане или вдишване. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Може да предизвика алергична кожна реакция. При продължително дразнене на очите: Потърсете медицински съвет/помощ. Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Буфер AW1



Съдържа гуанидин хидрохлорид. Внимание! Опасно за здравето при поглъщане или вдишване. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Ако се почувствате зле се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. Съдържанието/съдът да се изхвърли в одобрено за целта съоръжение. Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

QIAGEN протеаза



Съдържа: Субтилизин. Опасно! Предизвиква леко дразнене на кожата. Предизвиква сериозно увреждане на очите. Може да предизвика алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдишване. Избягвайте вдишване на прах/пушек/газ/дим/изпарения/аерозоли. Съдържанието/съдът да се изхвърли в одобрено за целта съоръжение. При симптоми на затруднено дишане: Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването. ПРИ ВДИШВАНЕ: При затруднено дишане изведете пострадалия на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането. Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. Носете респираторни предпазни средства.

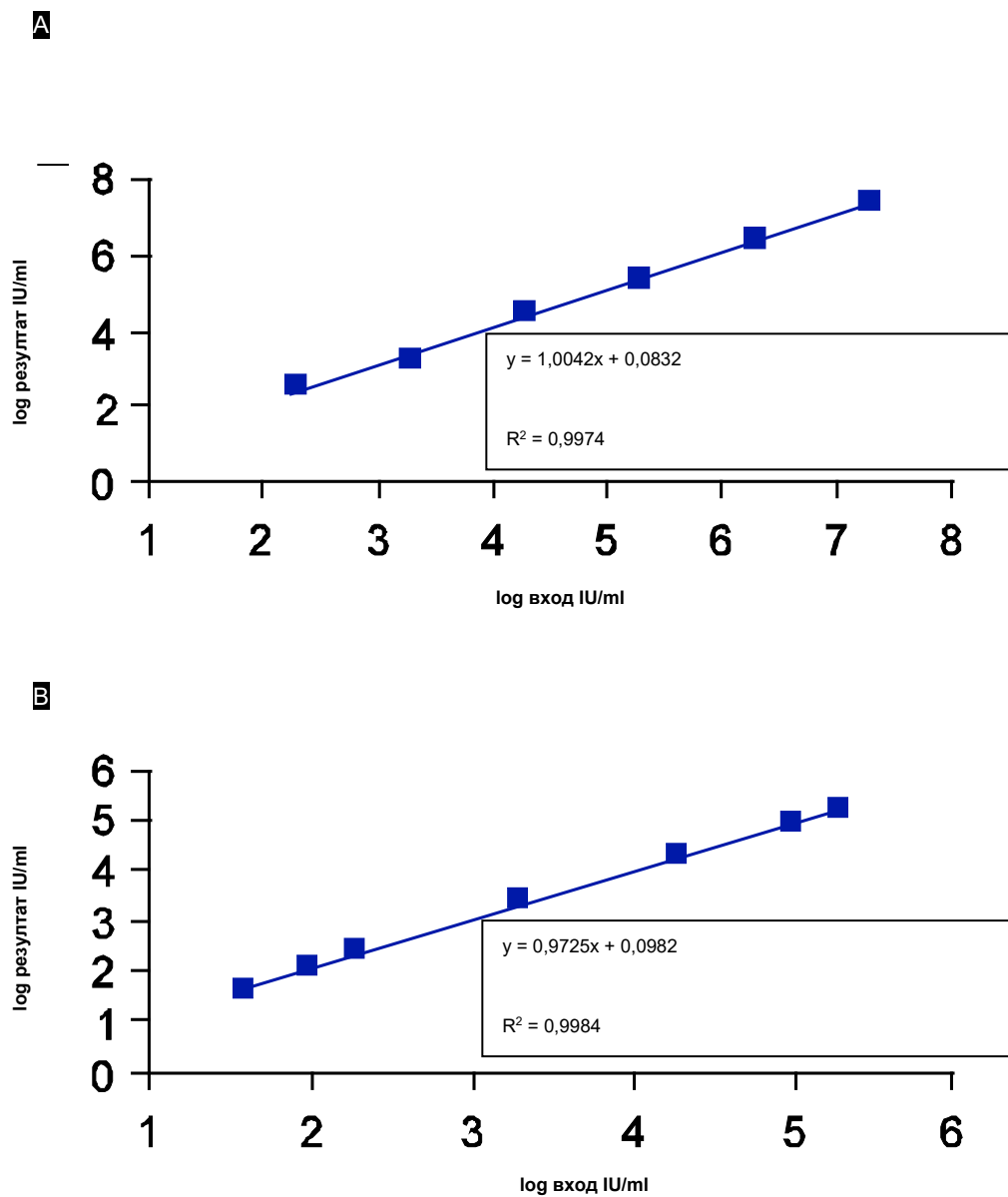
Въведение

Наборът QIAamp DSP Virus използва надеждна установена технология за едновременно изолиране и пречистване на вирусна ДНК и РНК. Процедурата QIAamp DSP Virus комбинира свойствата за селективно свързване на мембрана на базата на силиций с минимални елуиращи обеми от 20 µl или 60 µl.

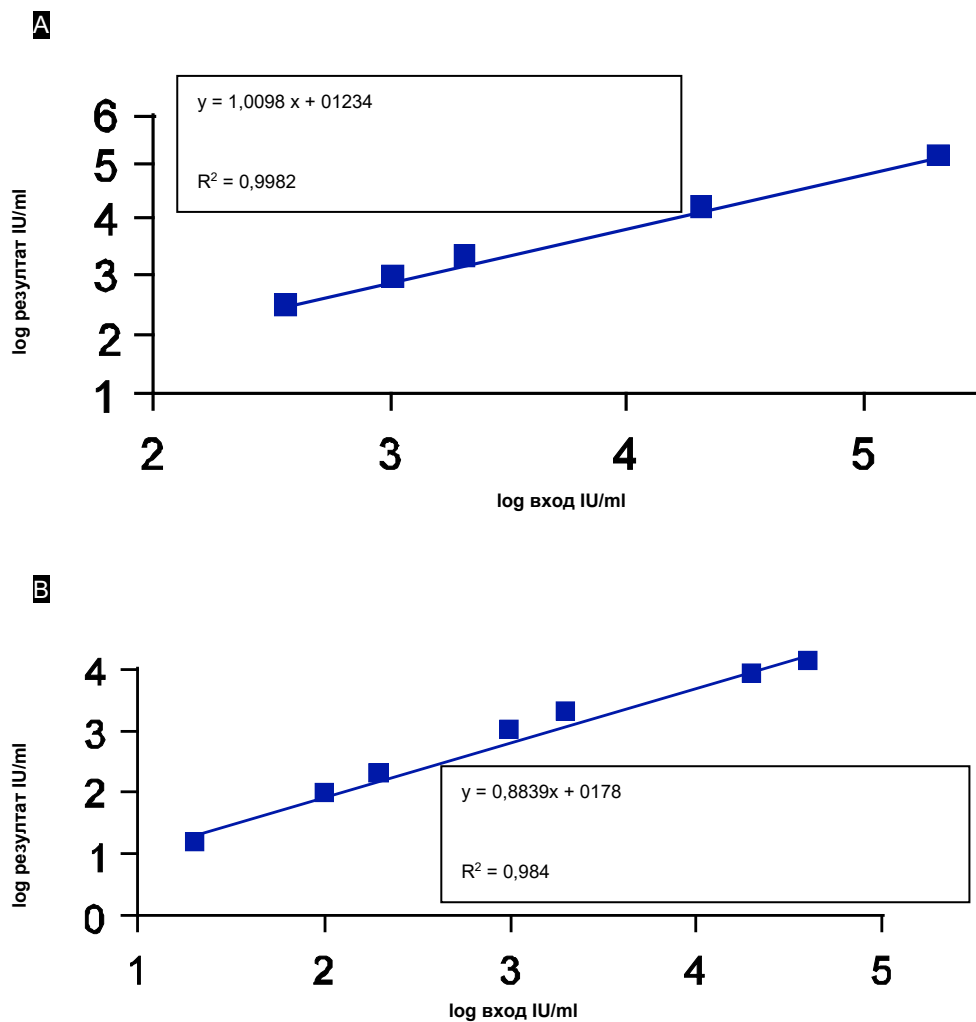
Линейният диапазон на процедурата QIAamp DSP Virus е определен за HIV РНК и HBV ДНК в няколко последващи диагностични анализи надолу по веригата (Таблица 1, Фигура 1 и Фигура 2).

Таблица 1.-Диагностични последващи анализи надолу по веригата, с които е определен линейния диапазон на процедурата QIAamp DSP Virus

Анализ	Набор
RT-PCR на HIV РНК в реално време	TaqMan® анализ и cobas® AMPLICOR HIV-1 MONITOR® тест
PCR на HBV ДНК в реално време	TaqMan анализ и cobas AMPLICOR HBV MONITOR® тест



Фигура 1. Линеен диапазон на процедура QIAamp DSP Virus, използваща анализ TaqMan. Линеиният диапазон на процедура QIAamp DSP Virus при 60 µl елуиращ обем е определен с анализ TaqMan за **A** HIV РНК и **B** HBV ДНК.



Фигура 2. Линеен диапазон на процедура QIAamp DSP Virus, използваща тестове cobas AMPLICOR MONITOR TaqMan. Линеиният диапазон на процедура QIAamp DSP Virus при 60 µl елуиращ обем е определен с тестове cobas AMPLICOR MONITOR за **A** HIV РНК и **B** HBV ДНК.

Процедурата е подходяща за използване с плазма или серум; всяко от които може да съдържа цитрат или EDTA. Пробите могат да бъдат пресни, лиофилизирани или замразени, при положение че не са били замразявани и размразявани повече от веднъж. Процедурата може да се използва за изолиране на вирусна РНК и ДНК от широк кръг РНК и ДНК вируси. Процедурата е предназначена да избегне кръстосано замърсяване проба-в-проба и да позволи безопасна обработка на потенциално инфекциозни проби. Процедурата е много подходяща за едновременна обработка на множество проби. Вирусните нуклеидни киселини се елуират с елуиращ буфер (AVE), готов за употреба в реакции на усилване или съхранение при -20°C.

Принцип и процедура

Процедурата QIAamp DSP Virus включва 4 стъпки:

- Лизиране на вирусни частици в пробата
- Свързване на вирусните нуклеидни киселини в лизата към мембраната на колона QIAamp MinElute
- Промиване на мембраната
- Елуиране на вирусните нуклеинови киселини от мембраната

Процедурата се осъществява с използване на колони QIAamp MinElute върху вакуумен колектор.

Обем на пробата

Границата на откриване (detection limit, DL) и границата на количествено определяне (quantification limit, QL), в съответствие с насоки ICH 2QA и 2QB, за процедурата QIAamp DSP Virus (с начален обем от 500 µl и елуиращи обеми от 20 µl и 60 µl) са определени с използване на различни последващи диагностични анализи надолу по веригата (Таблица 2 и Таблица 3).

Таблица 2.-Граница на откриване за процедура QIAamp DSP Virus

Анализ	Елуиращ обем	95% граница
artus [®] RealArt [™] HBV DNA	20 µl	2,31 IU/ml (n=240)
artus RealArt HCV RNA	20 µl	24,31 IU/ml (n=192)
AMPLICOR manual HIV RNA	60 µl	90,92 IU/ml (n=209)
TaqMan HBV DNA	60 µl	4,73 IU/ml (n=192)

Таблица 3.-Граница на количествено определяне за процедура QIAamp DSP Virus

Анализ	QL	CV
TaqMan HBV DNA	5,7 IU/ml	< 70% (n = 88)
TaqMan HIV RNA	52 IU/ml	< 60% (n = 88)
cobas AMPLICOR HIV RNA	100 IU/ml	< 60% (n = 88)
cobas AMPLICOR HBV DNA	30 IU/ml	< 60% (n = 88)
cobas AMPLICOR HCV RNA [®]	700 IU/ml	< 60% (n = 66)

Лизиране на вирусни частици

Пробите се лизират в денатурирани условия при повишени температури. Лизирането се осъществява в присъствието на QIAGEN протеаза (QP) и лизиращ буфер (AL), които заедно осигуряват деактивирането на RNases.

Свързване на вирусните нуклеидни киселини към мембраната на колона QIAamp MinElute

За оптимизиране на свързването на вирусни ДНК и РНК към мембраната на колона QIAamp MinElute първоначално към лизата се добавя етанол. След това всеки лизат се прилага към колона QIAamp MinElute, където вирусните нуклеидни киселини се абсорбират върху мембрана от силикагел, като лизатът се засмуква с вакуум.

Отстраняване на остатъчни замърсители

Докато вирусната нуклеинова киселина остава свързана към мембраната на колона QIAamp MinElute, замърсителите ефективно се отмиват с използването на промиващ буфер 1 (AW1), последван от промиващ буфер 2 (AW2) и накрая с етанол.

Елуиране на чисти нуклеинови киселини

Вирусните нуклеинови киселини се елуират от мембраната на колона QIAamp MinElute с използване на елуиращ буфер (AVE). Колоните QIAamp MinElute позволяват обеми на елуиране от 20 µl или 60 µl.

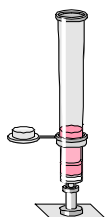
В зависимост от използвания последващ анализ по веригата, елуатът с нуклеинови киселини може да съставлява до 50% от реакционния обем без всякакви инхибиращи ефекти.

Процедура QIAamp DSP Virus

Проба

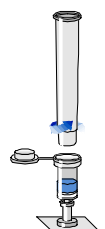


Лизиране



Свързване

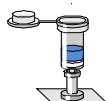
Вакуум



Промиване (AW1)

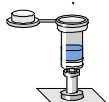
Отстранете EXT
преди да
приложите
вакуум

Вакуум



Промиване (AW2)

Вакуум



Промиване (етанол)

Вакуум



Сухо центрофугиране

Елуиране



Вирусна нуклеинова киселина

Преди да започнете прочетете внимателно протокола (страница 26)

В LT, добавете 75 µl QP, 500 µl проба и 500 µl AL

Вихрово разбъркване 15 сек

Инкубирайте 15 мин (± 1 мин) при 56°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

Добавете 600 µl етанол

Вихрово разбъркване 15 сек

Инкубирайте 5 мин (± 1 мин) при стайна температура (15 – 25°C)

Прехвърлете лизата в колона QIAamp MinElute Column с прикрепен EXT

Добавете 600 µl възстановен AW1

Отстранете EXT

Добавете 700 µl възстановен AW2

Добавете 750 µl етанол

Поставете колона QIAamp MinElute във WT

Центрофугирайте в продължение на 1 при 14 000 об./мин

Поставете колона QIAamp MinElute във WT

Инкубирайте 3 мин при 56°C

Поставете колона QIAamp MinElute във ET

Добавете 20 µl или 60 µl AVE

Инкубирайте 3 мин при стайна температура

Центрофугирайте в продължение на 1 при 14 000 об./мин

Оборудване и реагенти, които трябва да бъдат доставени от потребителя

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (ИБЛ), предоставяни от доставчика на продукта.

- Етанол (96 – 100%)
- Пипети* накрайници за пипети (за предотвратяване на кръстосано замърсяване, настоятелно препоръчваме използването на накрайници за пипети с аерозолни бариери)
- Ръкавици за еднократна употреба
- Термостат* за лизиране на проби при 56°C (ние препоръчваме Eppendorf® Thermomixer comfort с термостат за 2,0 ml микроепруветки†)
- Микроцентрофуга*
- Мерителен цилиндър (50 ml)
- Вихров смесител
- Вакуумна система QIAvac 24 Plus[‡] (QIAvac 24 Plus, кат.№ 19413, QIAvac Connecting System, кат. № 19419 и вакуумна помпа, кат. № 84020§), или еквивалентна обща лабораторна вакуумна система

* За да се гарантира правилната обработка на пробите по процедурата QIAamp DSP Virus настоятелно препоръчваме инструментите (напр., пипети и термостати) да са калибрирани в съответствие с инструкциите на производителя.


† Това е пълен списък на доставчици и не включва множество важни търговци на биологически консумативи.

‡ Предлага се от средата на 2004 г.; проверете www.qiagen.com/products/accessories.

§ Каталогният № 84020 се отнася за помпи, подходящи за страните от Европа (например Германия). За страни с други изисквания за напрежение или щепсели, се обърнете към техническата служба на QIAGEN.

Важни забележки

Важни забележки преди започване

- След получаване на набора, проверете неговите компоненти за повреди. Ако блистерните опаковки или бутилките с буфери са повредени, се обърнете към QIAGEN Technical Services или вашия местен дистрибутор. В случай на разливане на течност, направете справка със „Предупреждения и предпазни мерки“ (страница 8).
- Не използвайте повредени компоненти на набора, тъй като тяхната употреба може да доведе до влошени работни характеристики на набора.
- Винаги използвайте оборудване, свободно от RNase.
- По време на процедурата съхранявайте етанола (96 – 100%) върху лед.
- Винаги заменяйте накрайниците на пипетите между пренос на течности. За предотвратяване на кръстосано замърсяване препоръчваме използване на накрайници за пипети с аерозолна бариера.
- Всички стъпки, включващи центрофугиране се осъществява при стайна температура (15 – 25°C).
- Винаги използвайте ръкавици за еднократна употреба и редовно проверявайте дали те не са замърсени с материал от пробата.
- Изхвърлете ръкавиците, ако са замърсени, и при изпълнението на всички стъпки, обозначени със символ за ръкавица. 
- За предотвратяване на кръстосано замърсяване отваряйте епруветките една по една.
- Не използвайте компоненти от други набори с набора, който използвате в момента, освен ако номерата на партидите не са идентични.
- Не допускайте микробиологично замърсяване на реагентите на набора.
- За осигуряване на безопасност при работа с потенциално заразен материал, препоръчваме, до лизирането на пробите да се работи в условия на ламинарен въздушен поток.
- Този набор може да се използва единствено от персонал, обучен за in vitro диагностична практика.
- Процедурата съдържа инструкции за обработка на единична проба плазма или серум. Независимо от това, на вакуумната система QIAvac 24 Plus могат едновременно да бъдат обработени до 24 проби.

Подготовка на РНК

При подготовка на вирусна РНК, работете бързо по време на ръчните стъпки от процедурата.

Елуиращият буфер (AVE) съдържа натриев азид*, антимикробен агент, предотвратяващ растежа на организми произвеждащи RNase. Но тъй като този буфер не съдържа никакви химикали, разграждащи RNase, той няма активно да инхибира RNase, внесена при неправилна работа. При работа с елуиращ буфер (AVE) трябва да се проявява изключително внимание за предотвратяване на замърсяване с RNase.

Съхраняване на проби

След събиране и центрофугиране, плазмата или серума могат да бъдат съхранявани при температура 2 – 8°C в продължение на до 6 часа. За дълготрайно съхранение, се препоръчва замразяване при температури -20°C или -80°C в аликвотни части. Замразени проби плазма или серум не трябва да бъдат размразявани повече от един път. Многократно замразяване-размразяване предизвиква денатуриране и утаяване на протеини, което води до понижени вирусни титри, а оттук и по-нисък добив на вирусни нуклеинови киселини. Освен това, образуваните при цикъла замразяване-размразяване криопреципитати, ще задръстят мембраната на колоната QIAamp MinElute. Ако криопреципитатите са видими те трябва да бъдат утаени с центрофугиране с приблизително 6800 x g в продължение на 3 минути. Избистреният супернатант, трябва да бъде аспириран и обработен незабавно, без разбъркване на утайката.

Подготовка на реагенти и буфери

Подготовка на QIAGEN протеаза

Добавете цялото съдържание на епруветката, съдържаща 4,4 ml разтвор на протеаза (PS) към флакон лиофилизирана QIAGEN протеаза (QP) и внимателно ги смесете. За да избегнете образуване на пяна, смесвайте с неколkokратно преобръщане на флакона. Уверете се, че QIAGEN протеазата (QP) е напълно разтворена.



Не добавяйте QIAGEN протеаза (QP) директно в лизирания буфер (AL).

* При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила.

Добавяне на носеща РНК (CARRIER) и вътрешна контрола към лизиращ буфер

Носеща РНК (CARRIER) служи за две цели. Първо, подобрява свързването на вирусните нуклеинови киселини към мембраната на колона QIAamp MinElute, особено ако в пробата има много малко целеви молекули. Второ, добавката на големи количества носеща РНК (CARRIER) намалява шанса от разпадане на вирусната РНК в редкия случай, когато молекулите на RNase не са денатурирани от хаотропните соли и детергента в лизиращия буфер (AL). Ако носещата РНК (CARRIER) не бъде добавена към лизиращия буфер (AL), това може да доведе до намалена вирусна РНК или възстановена ДНК.

Носещата РНК (CARRIER) може да бъде включена в някои вътрешни контролни реагенти от последващи търговски анализи надолу по веригата. В тези случаи, направете справка със съответните инструкции за употреба, предоставени от производителя на последващия анализ надолу по веригата.

Използването на вътрешна контрола е силно препоръчително при използване на набора QIAamp DSP Virus в комбинация с диагностични системи за усилване. Вътрешната контролна РНК или ДНК и възстановена носеща РНК (CARRIER) трябва да бъдат добавени към лизиращия буфер (AL) и напълно смесени чрез десетократно преобръщане на епруветката. За да избегнете образуване на пяна не смесвайте с вихрово разбъркване.

Направете справка с инструкциите на производителя, за да определите оптималната концентрация на вътрешната контрола. Използване на концентрация, различна от препоръчаната, може да доведе до неверни резултати. При изчисляването на правилното количество използвано за вътрешна контрола, отчетете началния обем на пробата и елуиращия обем. Запомнете, че наборът QIAamp DSP Virus използва начален обем от 500 µl.

За приготвяне на разтвор на носеща РНК (CARRIER), добавете 310 µl елуиращ буфер (AVE) в епруветка, съдържаща 310 µg лиофилизирана носеща РНК (CARRIER), за получаване на разтвор 1 µg/µl. Разтворете носеща РНК (CARRIER) напълно и я разпределете на удобни аликвотни части, след което я съхранявайте при температура -20°C. Не замразявайте-размразявайте аликвотните части носещи РНК (CARRIER) повече от 2 пъти.

Отбележете, че носещата РНК (CARRIER) не се разтваря в лизиращ буфер (AL). Тя трябва първоначално да бъде разтворена в елуиращ буфер (AVE) и след това добавена към лизиращия буфер (AL). Уверете се, че носещата РНК (CARRIER) е напълно разтворена в правилния обем елуиращ буфер (AVE) преди да я смесите с лизиращия буфер (AL).



Винаги използвайте правилната вътрешна контрола за последващ анализ по веригата. За допълнителна информация направете справка с инструкциите на производителя.

Изчислете необходимия обем на сместа лизиращ буфер (AL)/носеца РНК (CARRIER), за една партида проби, като изберете броя проби, които трябва да бъдат обработени едновременно от Таблица 4. Обемите се изчисляват като се използва следното примерно изчисление:

$$n \times 0.55 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 11.2 \text{ } \mu\text{l/ml} = z \text{ } \mu\text{l}$$

където: **n** = брой проби, които трябва да бъдат обработени едновременно

y = изчислен обем лизиращ буфер (AL)

z = обем на носеща РНК (CARRIER)/елуиращ буфер (AVE), който трябва да бъде добавен към лизиращия буфер (AL)

Таблица 4.-Обеми лизиращ буфер (AL) и носеща РНК (CARRIER)/елуиращ буфер (AVE) за процедура QIAamp DSP Virus

Брой проби	Обем AL (ml)	Обем носеща РНК (CARRIER)/AVE (μl)	Брой проби	Обем AL (ml)	Обем носеща РНК (CARRIER)/AVE (μl)
1	0,55	6,2	13	7,15	80,0
2	1,10	12,3	14	7,70	86,0
3	1,65	18,5	15	8,25	92,4
4	2,20	24,6	16	8,80	98,6
5	2,75	30,8	17	9,35	104,7
6	3,30	37,0	18	9,90	110,9
7	3,85	43,1	19	10,45	117,0
8	4,40	49,3	20	11,00	123,2
9	4,95	55,0	21	11,55	129,4
10	5,50	61,6	22	12,10	135,5
11	6,05	67,8	23	12,65	141,7
12	6,60	73,9	24	13,20	147,8

Приготвяне на промиващ буфер 1

С използване на мерителен цилиндър, добавете 25 ml етанол (96 – 100%) към бутилката, съдържаща 19 ml концентриран промиващ буфер 1 (AW1). Съхранявайте възстановения промиващ буфер 1 (AW1) на стайна температура (15 – 25°C).



Преди започване на процедурата, винаги смесвайте възстановения промиващ буфер 1 (AW1), като неколkokратно преобърнете бутилката.

Приготвяне на промиващ буфер 2

С използване на мерителен цилиндър, добавете 30 ml етанол (96 – 100%) към бутилката, съдържаща 13 ml концентриран промиващ буфер 2 (AW2). Съхранявайте възстановения промиващ буфер 2 (AW2) на стайна температура (15 – 25°C).



Преди започване на процедурата, винаги смесвайте възстановения промиващ буфер 2 (AW2), като неколkokратно преобърнете бутилката.

Приготвяне на елуиращ буфер

С набора се предоставят четири епруветки елуиращ буфер (AVE). Внимавайте да не замърсите буфера с RNases. Ако с един набор извършите 4 или по-малко процедури за пречистване, препоръчваме да изхвърляте епруветката с елуиращ буфер (AVE) в края на всяка процедура.

Елуиране на вирусни нуклеинови киселини

За последващи приложения по веригата, изискващи малки начални обеми (напр. някои PCR и RT-PCR анализи), използването на вирусни нуклеинови киселини, елуирани в 20 µl елуиращ буфер (AVE), може да повиши чувствителността на анализа.

Обемът на вирусни нуклеинови киселини, елуирани от колона QIAamp MinElute, може да бъде до 5 µl по-малък от обема на елуиращия буфер (AVE), използван в колоната. Например, елуиране на вирусни нуклеинови киселини с 60 µl елуиращ буфер (AVE) води до приблизително 55 µl, докато елуиране с 20 µl води до приблизително 15 µl елуат.

Обемът на възстановения елуат, зависи от естеството на пробата. Ако обемът на възстановения елуат е твърде малък за последващия анализ надолу по веригата, повишете обема като добавите повече елуиращ буфер (AVE).

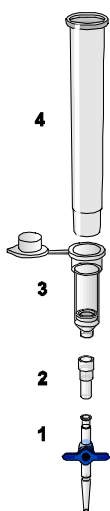
Елуираните вирусни нуклеинови киселини се събират в епруветки за елуиране (ЕТ). Ако вирусна нуклеинова киселина трябва бъде съхранявана до 24 часа, препоръчваме това да се извършва при температура 2 – 8°C.

Добив и качество на вирусни нуклеинови киселини

Добивът и качеството на изолирани вирусни нуклеинови киселини са подходящи за всички последващи надолу по веригата типове процедури за детекция в молекулярната диагностика. Диагностичните анализи трябва да бъдат извършени в съответствие с инструкциите на производителя.

Подготовка на вакуумната система QIAvac 24 Plus

Проверете дали сте поставили правилно удължителя за колона (EXT), колоната QIAamp MinElute, съединителят VacConnector (VC) и крана VacValve (вижте Фигура 3).



Фигура 3. Сглобяване на компонентите на набора QIAamp DSP Virus за вакуумна обработка на проби:

1: VacValve (доставя се с вакуумната система)

2: VacConnector (VC)

3: Колоната QIAamp MinElute

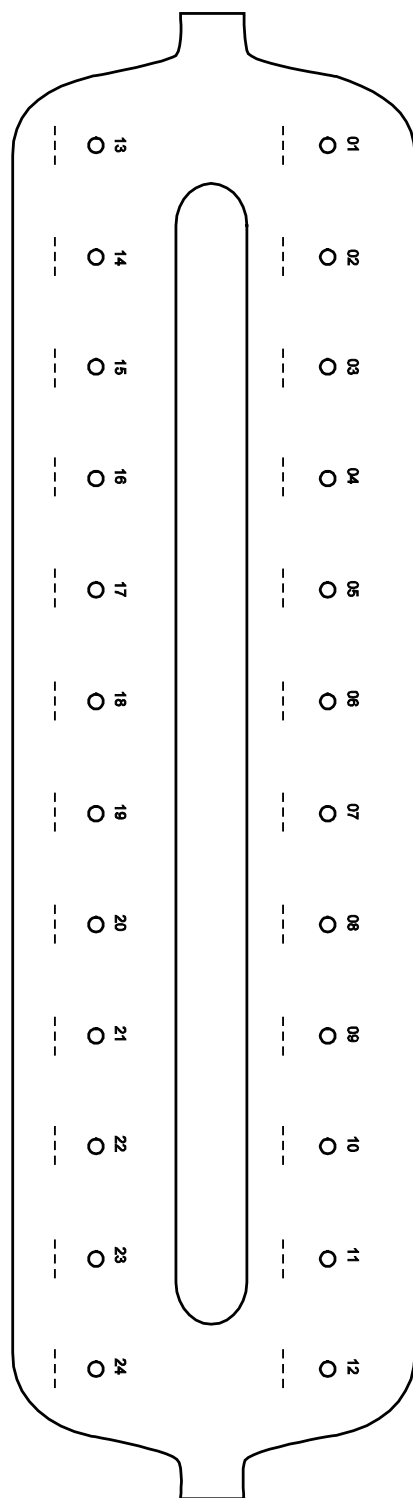
4: Удължител за колона (EXT)

За избягване на смесване на проби, препоръчваме етикетиране на епруветките за лизиране (LT), епруветките за елуиране (ET) и колоните QIAamp MinElute, използвани с вакуумната система QIAvac 24 Plus, съгласно схемата в Фигура 4. Тази фигура може да бъде фотокопирана и обозначена с имената на пробите.

Дата: _____

Оператор: _____

Идентификатор за изпълнение: _____



Фигура 4. Схема за етикетиране на епруветки за лизиране (LT), епруветки за елуиране (ET) и колони QIAamp MinElute, използвани с вакуумната система QIAvac 24 Plus.

Протокол: Изолиране и пречистване на вирусни нуклеинови киселини от плазма и серум

За изолиране и пречистване на вирусни нуклеинови киселини от 500 µl от EDTA- или обработени с плазма и серум.

Неща, които трябва да направите преди да започнете

- Кондиционирайте пробите до стайна температура (15 – 25°C) и се уверете, че се смесени добре.
- Добавете носеща РНК (CARRIER), възстановена в елуиращ буфер (AVE) или вътрешна контрола към лизиращ буфер (AL), в съответствие с инструкциите на страница 18.
- Уверете се, че промиваният буфер 1 (AW1), промиваният буфер 2 (AW2) и QIAGEN протеаза (QP) са приготвени съгласно инструкциите във „Важни бележки“ на страница 17.
- Кондиционирайте елуиращия буфер (AVE) до стайна температура (15 – 25°C) за да бъде използван на стъпка 18. Ако е възможно, използвайте пресен елуиращ буфер (AVE) за всяка процедура (предоставени са 4 епруветки).
- Настройте термостата на 56°C, за да бъде използван на стъпки 4 и 17.
- За да избегнете кръстосано замърсяване, вмъкнете VacConnector (VC) във всеки луеров адаптер на вакуумната система.
- Проверете дали бутилката за отпадъци на вакуумната система е празна и всички съединения са свързани правилно.
- За подробности относно работата с вакуумната система, и по-специално нейната поддръжка, вижте ръководството, предоставено с нея.

Процедура

1. Отпипетирайте 75 µl QIAGEN протеаза (QP) в епруетка за лизиране (LT).



Преди употреба проверете датата на срока на годност на възстановената протеаза.

2. Добавете 500 µl плазма или серум в епруетката за лизиране (LT).

3. Добавете 500 µl лизиращ буфер (AL) (съдържащ 11,2 µg/ml носеща РНК (CARRIER)) към епруетката за лизиране (LT), затворете капачето и смесете с пулсационно разбъркване за 15 секунди.


За осигуряване на ефективно лизиране е важно пробата и лизиращия буфер (AL) да бъдат смесени до получаване на хомогенен разтвор.



Лизиращият буфер (AL) съдържа вътрешна контрола. След като лизиращият буфер (AL) има висок вискозитет, добавете правилния обем от лизиращ буфер (AL) посредством внимателно пипетиране или с използване на подходяща пипета като многостепенната пипета Eppendorf или неин еквивалент.



Не добавяйте QIAGEN протеаза (QP) директно в лизиращия буфер (AL).

4. Инкубирайте при 56°C (±1°C) за 15 минути (±1 мин).
5. Центрофугирайте епруетката за лизиране (LT) за ≥5 секунди при пълна скорост за да отстраните капките от вътрешната част на капачето.
6.  Сменете ръкавиците и внимателно отворете епруетката за лизиране (LT).
7. Добавете 600 µl етанол (96 – 100%) към епруетката за лизиране (LT), затворете капачето и смесете напълно с пулсационно разбъркване за ≥15 секунди. Инкубирайте за 5 минути (±1 минута) на стайна температура (15 – 25°C).
8. Центрофугирайте епруетката за лизиране (LT) за ≥5 секунди при пълна скорост за да отстраните капките от вътрешната част на капачето.
9. Вмъкнете колоната QIAamp MinElute във VacConnector (VC) на вакуумната система (вижте Фигура 3, страница 22). Вмъкнете удължителя за колона (EXT) в отворената колона QIAamp MinElute.



Запазете епруетката за промиване (WT) за сухо центрофугиране на стъпка 16.



10. Сменете ръкавиците и отваряйте епруетките една по една.
11. Внимателно пренесете целия лизат от стъпка 7 в удължителя за колона (EXT) на колоната QIAamp MinElute без да намокрите ръба. Не допускайте докосване на мембраната на колоната QIAamp MinElute с накрайника на пипетата.
12. Включете вакуумната помпа. След като лизатът е засмукан през колоната QIAamp MinElute, отворете крана на вакуумната система и освободете вакуума.
Ако обработвате няколко колони QIAamp MinElute едновременно, препоръчваме да затваряте VacValve на всяка колона след като лизатът премине, за да съкратите продължителността на тази вакуумна стъпка.



Ако след 15 минути лизатът не е преминал напълно през мембраната, изхвърлете колоната QIAamp MinElute и повторете процедурата с нова проба.



Кранът на вакуумната система трябва да се използва за бързо освобождаване на вакуума.

13. Въведете 600 µl промиващ буфер 1 (AW1) в колоната QIAamp MinElute. Внимателно свалете и изхвърлете удължителя за колона (EXT), и затворете крана на вакуумната система. След като промиващият буфер 1 (AW1) е засмукан през колоната QIAamp MinElute, отворете крана и освободете вакуума.



За да избегнете кръстосано замърсяване се уверете че свалените удължители (EXT) не преминават през съседни колони QIAamp MinElute.

14. Въведете 750 µl промиващ буфер 2 (AW2) в колоната QIAamp MinElute без да намокрите ръба. Не допускайте докосване на мембраната на колоната QIAamp MinElute с накрайника на пипетата. Оставете капака на колоната отворен и затворете крана на вакуумната система. След като промиващият буфер 2 (AW2) е засмукан през колоната QIAamp MinElute, отворете крана и освободете вакуума.

15. Въведете 750 µl етанол (96 – 100%) в колоната QIAamp MinElute без да намокрите ръба. Не допускайте докосване на мембраната на колоната QIAamp MinElute с накрайника на пипетата. Оставете капака на колоната отворен и затворете крана на вакуумната система. След като етанолът е засмукан през колоната QIAamp MinElute, отворете крана и освободете вакуума.



За въвеждане на етанол в колона QIAamp MinElute използвайте пипета с накрайници с аерозолна бариера.

16. Затворете капака на колоната QIAamp MinElute, свалете я от вакуумната система и изхвърлете VacConnector (VC). Поставете колоната QIAamp MinElute в епруветката за промиване (WT) запазена от стъпка 9, и центрофугирайте на пълна скорост (приблизително 20 000 x g, или 14 000 об./мин) в продължение на 1 минута, за да изсушите мембраната напълно. Изхвърлете епруветката за промиване (WT) съдържаща филтрат.



Пропускане на центрофугирането за изсушаване може да доведе до затрудняване на последващи анализи по веригата.

17. Поставете колоната QIAamp MinElute Column в нова епруветка за промиване (WT), и инкубирайте с отворен капак при 56°C за 3 минути, за да изпарите всякаква останала течност.

18. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста епруветка за елуиране (ET), и изхвърлете епруветката за промиване (WT). Внимателно отворете капака на колоната QIAamp MinElute и нанесете 20 µl или 60 µl елуиращ буфер (AVE) (в зависимост от последващия анализ по веригата) в центъра на мембраната. Затворете капака и инкубирайте при стайна температура (15 – 25°C) за ≥3 минути. Центрофугирайте на пълна скорост (приблизително 20 000 x g, или 14 000 об./мин) в продължение на 1 минута, за да елуирате вирусните нуклеинови киселини.



След като изпълните този протокол, следвайте процедурите за поддръжка на вакуумната система (за повече информация вижте ръководството предоставено с вакуумната система).

За актуална информация относно лицензирането и заявления за отказ от отговорност за конкретни продукти, вижте съответното ръководство или ръчника за потребителя на набора QIAGEN. Ръководствата и ръчниците за потребителя на набора QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за технически услуги на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

История на редакции

История на редактиране на документа	
R4 08/2018	Добавена пояснителна бележка за кат.№ на вакуумна помпа, вижте страница 16. Актуализиран формат на ръководството.

Ограничено лицензно споразумение за XXXXX [въведете името на продукта]

Използването на продукта означава, че закупилите или използващите продукта лица приемат следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящото ръководство, както и само с компонентите, включени в набора. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този набор с каквито и да са компоненти, които не са включени в него, с изключение на описаните в протоколите, предоставени с продукта, ръководството и допълнителните протоколи, които можете да намерите на www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са щателно тествани или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN нито предоставя гаранция, нито заявява, че те не нарушават правата на други производители.
2. Освен изрично посочените лицензи QIAGEN не дава никаква гаранция, че този набор и/или неговата употреба(и) не нарушават права на други производители.
3. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично отхвърля всички други лицензи, посочени или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат каквито и да са стъпки, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да приложи забраните в настоящото Ограничено лицензионно споразумение в който и да е съд и ще възстанови всичките си разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатски хонорари, при всяко действие за прилагане на Ограниченото лицензионно споразумение или някое от правата на интелектуална собственост, свързани с набора и/или неговите компоненти.

За актуални условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

Търговски марки: QIAGEN®, QIAamp®, artus®, MinElute® (QIAGEN Group); AMPLICOR HBV MONITOR®, AMPLICOR HCV MONITOR®, AMPLICOR HIV-1 MONITOR®, cobas®, TaqMan® (Roche Group); RealArt™ (artus GmbH); Eppendorf® (Eppendorf AG). Регистрираните имена, търговските марки и т.н., използвани в този документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона.

Процесът PCR е обхванат от патенти на САЩ 4 683 195 и 4 683 202 и чуждестранни еквиваленти, собственост на Hoffmann-La Roche AG.

1114514 08/2018 HB-0109-003 © 2018 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчване www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка support.qiagen.com | Уебсайт www.qiagen.com