

Ръководство за QIAamp® DSP Virus Spin Kit



Версия 1

За ин витро диагностика



61704



1062686BG



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ГЕРМАНИЯ

R6



1062686BG



QIAGEN Sample and Assay Technologies

QIAGEN е водещ доставчик на иновативни технологии за проби и анализи, позволяващи изолиране и откриване на съдържание във всяка биологична проба. Нашите модерни висококачествени продукти и услуги гарантират успех от вземането на проба до получаването на резултат.

QIAGEN задава стандартите при:

- пречистване на ДНК, РНК и протеини;
- анализи на нуклеинови киселини и протеини;
- изследване на микроРНК и РНК интерференция (RNA interference, RNAi);
- автоматизиране на технологиите за проби и анализи.

Мисията ни е да ви осигуряваме възможности за постигане на изключителни успехи и открития. За повече информация посетете www.qiagen.com.

Съдържание

Предназначение	4
Кратко изложение и обяснение	4
Принципи на процедурата	4
Автоматизирано пречистване на вирусни нуклеинови киселини в QIAcube	4
Предоставени материали	10
Съдържание на набора	10
Необходими, но непредоставени материали	12
Предупреждения и предпазни мерки	13
Съхранение и работа на реактивите	15
Съхранение и работа с пробите	15
Процедура	16
Важни забележки преди започване	16
Работа с колоните QIAamp MinElute	16
Центрофугиране	17
Обработване на колоните QIAamp MinElute в микроцентрофуга	17
Подготовка на реактиви и буфери	18
Протокол: Пречистване на вирусни нуклеинови киселини от плазма или серум	23
Контрол на качеството	26
Ограничения	26
Работни характеристики	26
Литературни източници	26
Символи	27
Информация за контакти	28
Приложение	29

Предназначение

QIAamp DSP Virus Spin Kit е система, използваща технология с мембрана от силициев диоксид (технология QIAamp), за изолиране и пречистване на вирусни нуклеинови киселини от биологични проби.

Продуктът е предназначен за употреба от професионални потребители като техници и лекари, обучени за прилагане на техники от молекулярната биология.

QIAamp DSP Virus Spin Kit е предназначен за ин витро диагностика.

Кратко изложение и обяснение

QIAamp DSP Virus Spin Kit използва утвърдена технология за едновременно пречистване на вирусна ДНК и РНК. Наборът комбинира свойствата за селективно свързване на мембрана въз основа на силициев диоксид с разнообразни обеми на елуиране от 20 µl до 150 µl. Процедурата е подходяща за употреба с плазма и серум. Пробите може да са пресни или замразени, при положение че не са били замразявани и размразявани повече от веднъж (вижте страница 15). Вирусните нуклеинови киселини се елуират с буфер AVE, готов за употреба в реакции на усилване или съхранение от -25° C до -15° C.

Принципи на процедурата

Процедурата QIAamp DSP Virus Spin се състои от 4 стъпки (лизиране, свързване, промиване и елуиране) и се провежда с помощта на колоните QIAamp MinElute® в стандартна микроцентрифуга или напълно автоматизирано в QIAcube®. Процедурата е предназначена да сведе до минимум възможността за кръстосано замърсяване между пробите и осигурява безопасна обработка на потенциално инфекциозни проби. Опростената процедура QIAamp DSP Virus Spin е подходяща за едновременно обработване на няколко проби. QIAamp DSP Virus Spin Kit може да се използва за изолиране на вирусна РНК и ДНК от широк кръг РНК и ДНК вируси. Работните характеристики обаче не са установени за всеки вид вируси и трябва да се проверяват от потребителя.

Автоматизирано пречистване на вирусни нуклеинови киселини в QIAcube

Пречистването на вирусни нуклеинови киселини с помощта на QIAamp DSP Virus Spin Kit може да бъде напълно автоматизирано в QIAcube. Иновативният апарат QIAcube използва съвременна технология за обработване на центрофугиращи колонии QIAGEN®, която позволява безпроблемно интегриране на автоматизираното приготвяне на малък

брой проби в работния процес на вашата лаборатория. Приготвянето на проби с помощта на QIAcube включва същите стъпки като ръчната процедура (т.е. лизиране, свързване, промиване и елуиране) и ви дава възможност да използвате QIAamp DSP Virus Spin Kit за пречистване на висококачествени вирусни нуклеинови киселини.

Ако автоматизирате QIAamp DSP Virus Spin Kit в апарата QIAcube, възможно е апаратът да обработва по-малко от 50 проби поради мъртви обеми, изпарение и допълнително консумиране на реактиви от автоматизираното пипетиране. QIAGEN гарантира приготвяне на 50 проби само с ръчна употреба на QIAamp DSP Virus Spin Kit.

За повече информация относно автоматизираната процедура вижте съответния лист от протокола на адрес www.qiagen.com/MyQIAcube. Можете да изтеглите безплатно актуални листове от протокола или да ги получите, като се свържете с отдела за техническо обслужване на QIAGEN (вижте страница 28).



Фигура 1. QIAcube.

Лизиране с протеаза QIAGEN

Пробите се лизират в силно денатурирани условия при повишени температури. Лизирането се осъществява в присъствието на протеаза QIAGEN и буфер AL, които заедно осигуряват деактивирането на РН-азите.

Адсорбиране в мембраната QIAamp MinElute

Условията на свързване се регулират чрез добавяне на етанол за осигуряване на оптимално свързване на вирусните РНК и ДНК към мембраната. След това лизатите се прехвърлят в колона QIAamp MinElute, където вирусните нуклеинови киселини се адсорбират върху мембрана от силикагел, като лизатът се засмуква чрез центрофугиране. Концентрацията на соли и рН не позволява задържане на протеини и други замърсители, които могат да инхибират полимеразните верижни реакции (polymerase chain reactions, PCR) и други ензимни реакции надолу по веригата, върху мембраната QIAamp MinElute.

Епруветките за промиване 2 ml (предоставени) поддържат колоната QIAamp MinElute в стъпките на зареждане и промиване.

Отстраняване на остатъчни замърсители

Нуклеиновите киселини остават свързани към мембраната, а замърсителите ефективно се промиват в 3 стъпки. Във всяка от стъпките силно пречистени вирусни РНК и ДНК се елуират в буфер AVE със стайна температура.

Елуиране на чисти нуклеинови киселини

Елуирането се извършва с помощта на буфер AVE. Колоните QIAamp MinElute позволяват минимални обеми на елуиране от едва 20 µl. Малките обеми на елуиране осигуряват силно концентрирани елуати от нуклеинови киселини.

За последващи приложения по веригата, изискващи малки начални обеми (напр. някои анализи PCR и RT-PCR), използването на по-концентриран елуат може да повиши чувствителността на анализа.

За последващи приложения по веригата, изискващи по-голям начален обем, обемът на елуиране може да се увеличи до 150 µl. Увеличаването на обема на елуиране обаче ще намали концентрацията на нуклеинови киселини в елуата.

Възстановеният обем на елуиране може да е до 5 µl по-малък от обема на елуиращия буфер, приложен към колоната. Например обем на елуиране 20 µl води до >15 µl краен елуат. Обемът на възстановения елуат зависи от естеството на пробата.

Елуираната нуклеинова киселина се събира в епруветки за елуиране (elution tubes, ET) 1,5 ml (предоставени). Не се препоръчва съхранение на ДНК или РНК при -20° C.

Получените количества вирусни нуклеинови киселини, изолирани от биологични проби, обикновено са под 1 µg. За определяне на получените количества се препоръчват количествени методи на усилване. Не забравяйте, че при количествено определяне на нуклеинови киселини, изолирани по протокола на QIAamp DSP Virus Spin, ще има значително повече носещи РНК, отколкото вирусни РНК.

Процедура QIAamp DSP Virus Spin



Може напълно да се автоматизира в QIAcube

Носеща РНК

Носещата РНК служи за две цели: Първо, подобрява свързването на вирусните нуклеинови киселини към мембраната QIAamp, особено ако в пробата има много малко целеви молекули. Второ, добавянето на големи количества носеща РНК намалява шанса от разпадане на вирусната РНК в редкия случай, когато молекулите на RN-аза избегнат денатуриране от хаотропните соли и детергента в буфера AL. Ако към лизирация буфер AL не се добави носеща РНК, това може да доведе до намалена вирусна РНК или възстановяване на ДНК.

Различните системи за усилване имат различна ефикасност в зависимост от общото количество нуклеинови киселини, участващи в реакцията. Елуатите от този набор съдържат както вирусни нуклеинови киселини, така и носещи РНК, а количествата на носещите РНК значително превишават количествата на вирусните нуклеинови киселини. Следователно изчисленията колко елуат да се добави към усилванията надолу по веригата зависят от количеството на добавените носещи РНК. За получаване на най-високите нива на чувствителност в усилващите реакции може да е необходимо коригиране на количеството носещи РНК, добавени към буфера AL.

Добавяне на вътрешни контроли



Използването на протокола на QIAamp DSP Virus Spin в комбинация с предлагащи се на пазара усилващи системи може да налага въвеждане на вътрешна контрола в пречистващата процедура. Вътрешните контролни РНК или ДНК трябва да се добавят заедно с носещите РНК към лизирация буфер. За оптимална ефикасност на пречистването вътрешните контролни молекули трябва да са по-дълги от 200 нуклеотида, тъй като по-малките молекули не се възстановяват ефикасно.

За определяне на оптималната концентрация вижте инструкциите на производителя. Използването на концентрация, различна от препоръчителната, може да намали ефикасността на усилването.

Предоставени материали

Съдържание на набора

QIAamp DSP Virus Spin Kit			
Каталожен №			61704
Брой приготвени проби			50\$
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Колони QIAamp MinElute с епруветки за промиване) (WT) (2 ml)	COL	50
LT	Lysis Tubes (Епруветки за лизиране) (2 ml)	LYS TUBE	50
ET	Elution Tubes (Епруветки за елуиране) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
WT	Wash Tubes (Епруветки за промиване) (2 ml)	WASH TUBE	5 x 50
AL	Lysis Buffer* (Лизиращ буфер)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Промиващ буфер 1 (концентрат))	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Промиващ буфер 2 (концентрат))	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE	Elution Buffer† (Елуиращ буфер (лилави капачки))	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent† (Протеазен разтворител)	QPROT SOLV	4,4 ml
Носител	Carrier RNA (Носеща РНК (CARRIER) (червени капачки))	CAR RNA	310 µg

QP	QIAGEN Protease [‡] (QIAGEN протеаза)		1 флакон
	Handbook (Ръководство)		1

* Съдържа хаотропна сол. При работа спазвайте подходящи мерки за безопасност и носете ръкавици. Несъвместимо с дезинфектанти, съдържащи избелващи реактиви. За повече информация вижте страница 13.

† Съдържа натриев азид като консервант.

‡ Вижте „Подготовка на реактиви и буфери“, страница 18.

§ Ако автоматизирате QIAamp DSP Virus Spin Kit в апарата QIAcube, възможно е апаратът да обработва по-малко от 50 проби поради мъртви обеми, изпарение и допълнително консумиране на реактиви от автоматизираното пипетиране. QIAGEN гарантира приготвяне на 50 проби само с ръчна употреба на QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Необходими, но непредоставени материали

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 (safety data sheets, SDS), които може да получите от доставчика на продукта.

- Етанол (96 – 100%)*
- Пипети[†] и накрайници за пипети (за предотвратяване на кръстосано замърсяване – силно препоръчваме да използвате накрайници за пипети с аерозолни бариери)
- Термостат[†] за лизиране на проби при 56° C
- Микроцентрифуга[†] (с ротор за епруветки 1,5 ml и 2 ml)
- Вихров смесител
- За проби < 200 µl: 0,9% разтвор на NaCl

* Не използвайте денатуриран спирт, който съдържа други вещества като метанол или метилетилкетон.

[†] За да се гарантира правилната обработка на пробите в процедурите с QIAamp DSP Virus Spin Kit, силно препоръчваме инструментите (напр. пипети и термостати) да са калибрани съгласно инструкциите на производителя.

Предупреждения и предпазни мерки

За ин витро диагностика

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 (SDS). Тези листове са налични онлайн в удобен и компактен PDF формат на адрес www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.



ВНИМАНИЕ: НЕ ДОБАВЯЙТЕ избелващи или кисели разтвори директно в контейнера за отпадъци, съдържащ буфер AL или буфер AW1.

Буферът AL и буферът 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 ги изхвърляте, 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 процедурите QIAamp DSP Virus Spin. 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 QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Буфер AL



Съдържа: гуанидин хидрохлорид; малеинова киселина. Предупреждение! 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/облекло/очила/маска за лице.

Буфер AW1



Съдържа гуанидин хидрохлорид. Предупреждение! Опасно за здравето при поглъщане или вдишване. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Ако се почувствате зле, се свържете с ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или с лекар. Съдържанието/съдът да се изхвърли в одобрено за целта съоръжение. Свалете замърсеното облекло и го изперете преди повторна употреба. Използвайте предпазни ръкавици/облекло/очила/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: Свържете се с ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или с 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 свържете с ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или с лекар. Използвайте предпазни ръкавици/облекло/очила/маска за лице. Носете респираторни предпазни средства.

Съхранение и работа на реактивите

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 на срока на годност лиофилизираната носеща РНК може да бъде съхранявана при стайна температура (15 – 25° C). Носещата РНК може да бъде разтваряна само в буфер AVE. Разтворената носеща РНК трябва незабавно да се добави към 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, разтворени в буфер AVE трябва да бъдат замразени в аликвотни части при -30° C до -15° C.

До изтичане на срока на годност лиофилизираната протеаза QIAGEN (QP) може да бъде съхранявана при стайна температура (15 – 25° C) без влошаване на свойствата.

Протеазата QIAGEN (QP), разтворена в протеазен разтворител (protease solvent, PS), е стабилна до една година при температура 2 – 8° C, но само до изтичане на срока на годност на набора. Избягвайте съхранението на фабричен разтвор на протеаза QIAGEN при стайна температура за продължителен период от време.

Разтвореният промиващ буфер 1 (AW1) и разтвореният промиващ буфер 2 (AW2) са стабилни до 1 година при съхраняване на стайна температура (15 – 25° C), но само до изтичане на срока на годност на набора.

Съхранение и работа с пробите

След вземане и центрофугиране плазмата или серумът може да се съхраняват 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. Многократното замразяване и размразяване предизвиква денатуриране и утаяване на протеини, което води до понижени вирусни титри, а оттук и до по-нисък добив на вирусни нуклеинови киселини. Освен това образуваните при цикъла замразяване-размразяване криопреципитати ще задръстят мембраната на QIAamp MinElute. Ако криопреципитатите са видими, те може да бъдат утаени чрез центрофугиране с приблизително 6800 x g в продължение на 3 минути. Избистреният супернатант трябва да бъде отстранен и обработен незабавно, без да разбърквате утайката.

Процедура

Важни забележки преди започване

- След получаване на набора проверете неговите компоненти за повреди. Ако блистерните опаковки или бутилките с буфери са повредени, обърнете се към отдела за техническо обслужване на QIAGEN или местния си дистрибутор. При разливане на течност вижте „Предупреждения и предпазни мерки“ (страница 13). Не използвайте повредени компоненти от набора, тъй като това може да влоши свойствата му.
- Винаги използвайте оборудване без РН-аза.
- Винаги заменяйте накрайниците на пипетите между пренос на течности. За свеждане на кръстосаното замърсяване до минимум препоръчваме използване на накрайници за пипети с аерозолна бариера.
- Всички стъпки, включващи центрофугиране, се осъществяват 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 се замърсят.
- За свеждане на кръстосаното замърсяване до минимум отваряйте епруветките една по една.
- Не използвайте компоненти от други набори заедно с набора, който използвате в момента, освен ако номерата на партидите не са идентични.
- Не допускайте микробиологично замърсяване на реактивите 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 ин витро диагностична лабораторна практика.

Работа с колоните QIAamp MinElute

Поради чувствителността на технологиите за усиление на нуклеинови киселини са необходими следните предпазни мерки, когато работите с колоните QIAamp MinElute, за да избегнете кръстосано замърсяване между приготвените проби:

- Внимателно въведете пробата или разтвора в колоната QIAamp MinElute. Пипетирайте пробата в колоната QIAamp MinElute, без да намокряте ръба ѝ.
- Заменяйте накрайниците на пипетите преди всеки пренос на течности. Препоръчително е използване на накрайници за пипети с аерозолна бариера.
- Не докосвайте мембраната на QIAamp MinElute с накрайника на пипетата.
- След всички стъпки на пулсационно разбъркване центрофугирайте за кратко микроцентрофужните епруветки, за да отстраните капките от вътрешността на капачето.
- Носете ръкавици по време на цялата процедура. Ако ръкавиците влязат в контакт с пробата, незабавно ги сменете.

Центрофугиране

- Заедно с набора за всички стъпки на центрофугиране са предоставени епруветки за промиване и елуиране.
- Центрофугирането на колоните QIAamp MinElute се извършва при приблизително 6000 x *g*, за да се намали шумът. Центрофугирането на колоните QIAamp MinElute при максимална скорост няма да засегне полученото количество ДНК или РНК.
- Сухото центрофугиране в края на промиването и елуирането трябва да се извършва при максимална скорост.
- Всички стъпки на центрофугиране трябва да се осъществяват при стайна температура (15 – 25° C).

Обработване на колоните QIAamp MinElute в микроцентрофуга

- Затворете колоната QIAamp MinElute, преди да я поставите в микроцентрофугата. Центрофугирайте, както е описано.
- Извадете колоната QIAamp MinElute и епруветката за промиване от микроцентрофугата.
- Поставете колоната QIAamp MinElute в нова епруветка за промиване. Изхвърлете филтрат и епруветката за промиване. Моля, имайте предвид, че филтратът може да съдържа опасни отпадъци и трябва да се изхвърли по подходящ начин.
- Отваряйте само по една колона QIAamp MinElute едновременно и се постарайте да избегнете образуването на аерозоли.

За ефикасно паралелно обработване на няколко проби препоръчваме да напълните статива с епруветки за промиване, така че колоните QIAamp MinElute да може да се прехвърлят след центрофугиране. Може да изхвърлите използваните епруветки за промиване, съдържащи филтратата, и да поставите новите епруветки за промиване, съдържащи колоните QIAamp MinElute, директно в микроцентрофугата.

Подготовка на реактиви и буфери

■ Приготвяне на РНК

Когато приготвяте РНК, изпълнявайте бързо ръчните стъпки от процедурата, а преди да започнете, прочетете приложението на страница 29.

■ Подготовка на протеаза QIAGEN

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



Не добавяйте протеаза QIAGEN (QP) директно в буфера AL.*

Протеазата QIAGEN (QP), разтворена в протеазен разтворител (PS), е стабилна до една година при температура 2 – 8° C, но само до изтичане на срока на годност на набора. Избягвайте съхранението на фабричен разтвор на протеаза QIAGEN при стайна температура за продължителен период от време.

■ Добавяне на носеща РНК към буфер AL*

Добавете 310 µl буфер AVE в епруветка, съдържаща 310 µg лиофилизирана носеща РНК, за да получите разтвор 1 µg/µl. Разтворете напълно носещата РНК и я разпределете на удобни аликвотни части, след което я съхранявайте при температура от -25° C до -15° C. Не замразявайте и размразявайте аликвотните части носеща РНК повече от 3 пъти.

* Съдържа хаотропна сол. При работа спазвайте подходящи мерки за лабораторна безопасност и носете ръкавици. Несъвместимо с дезинфектанти, съдържащи избелващи реактиви. Вижте страница 11 за информация относно безопасността.



Носещата РНК не се разтваря в буфер AL. Първо трябва да се разтвори в буфер AVE и след това да се добави към буфер AL.

Изчислете обема на сместа от буфер AL и носеща РНК, необходим за една партида проби, като изберете броя проби, които трябва да бъдат обработени едновременно, от таблица 1 на страница 17. За по-голям брой проби обемите може да се изчислят чрез примерните формули по-долу:

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

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

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

y = изчислен обем буфер AL

z = обем на носещата РНК и буфера AVE, който трябва да бъде добавен към буфера AL

Смесете внимателно, като обърнете епруветката 10 пъти. За да избегнете образуване на пяна не смесвайте с вихрово разбъркване.

Таблица 1. Обеми на буфер AL и смес РНК-буфер AVE, необходими за определен брой проби за процедурата QIAamp DSP Virus Spin

Брой проби	Обем буфер AL (ml)	Обем носеща РНК AVE (µl)	Брой проби	Обем буфер AL (ml)	Обем носеща РНК AVE (µl)
1	0,22 ml	6,2 µl	13	2,86 ml	80,1 µl
2	0,44 ml	12,3 µl	14	3,08 ml	86,3 µl
3	0,66 ml	18,5 µl	14	3,30 ml	92,4 µl
4	0,88 ml	24,6 µl	16	3,52 ml	98,6 µl
5	1,10 ml	30,8 µl	17	3,74 ml	104,7 µl
6	1,32 ml	37,0 µl	18	3,96 ml	110,9 µl
7	1,54 ml	43,1 µl	19	4,18 ml	117,0 µl
8	1,76 ml	49,3 µl	20	4,40 ml	123,2 µl
9	1,98 ml	55,4 µl	21	4,62 ml	129,4 µl
10	2,20 ml	61,6 µl	22	4,84 ml	135,5 µl
11	2,42 ml	67,8 µl	23	5,06 ml	141,7 µl
12	2,64 ml	73,9 µl	24	5,28 ml	147,8 µl




Процедурата за приготвяне на проби е оптимизирана за 5,6 µg носеща РНК на проба. Ако сте установили, че за усилващата ви система е подходящо по-малко количество носеща РНК, прехвърлете само него в епруветките, съдържащи буфер AL. За всеки микрограм носеща РНК, необходим за приготвената проба, добавете по 5 µl буфер AVE-разтворена носеща RNA на милилитър буфер AL. Използването на по-малко от 5,6 µg носеща РНК на проба трябва да се утвърди за всеки конкретен тип проба и анализ надолу по веригата.

Буфер AW1*

Добавете 25 ml етанол (96 – 100%) в бутилка, съдържаща 19 ml концентрат на буфер AW1, както е описано върху бутилката. Маркирайте квадратчето на етикета, за да укажете, че е добавен етанол.


Съхранявайте разтворения буфер AW1 на стайна температура (15 – 25° C). Разтвореният буфер AW1 е стабилен до една година на стайна температура, но само до изтичане на срока на годност на набора.

 Винаги преди започване на процедурата разбърквайте разтворения буфер AW1 чрез разклащане.

Буфер AW2†

Добавете 30 ml етанол (96 – 100%) в бутилка, съдържаща 13 ml концентрат на буфер AW2, както е описано върху бутилката. Маркирайте квадратчето на етикета, за да укажете, че е добавен етанол.

Съхранявайте разтворения буфер AW2 на стайна температура (15 – 25° C). Разтвореният буфер AW2 е стабилен до една година на стайна температура, но само до изтичане на срока на годност на набора.

 Винаги преди започване на процедурата разбърквайте разтворения буфер AW2 чрез разклащане.

Елуиране на нуклеинови киселини

Елуирацият буфер трябва да достигне стайна температура, преди да бъде въведен в колоната.

* Съдържа хаотропна сол. При работа спазвайте подходящи мерки за лабораторна безопасност и носете ръкавици. Несъвместимо с дезинфектанти, съдържащи избелващи реактиви. Вижте страница 11 за информацията относно безопасността.

† Съдържа натриев азид като консервант.

Протокол: Пречистване на вирусни нуклеинови киселини от плазма или серум

Този протокол е за пречистване на вирусни нуклеинови киселини от 200 µl плазма или серум с помощта на QIAamp DSP Virus Spin Kit и микроцентрифуга. За автоматизирано пречистване чрез QIAamp DSP Virus Spin Kit с QIAcube вижте *Ръководството за потребителя на QIAcube* и съответния лист от протокола.



Важна забележка преди започване

- Всички стъпки, включващи центрофугиране, се осъществяват при стайна температура (15 – 25° C).



Неща, които трябва да направите, преди да започнете

- Оставете пробите да достигнат стайна температура (15 – 25° C).
- Оставете буфера AVE да достигне стайна температура за стъпката на елуиране 14.
- Настройте термостата на 56° C ±3° C, за да бъде използван в стъпка 4.
- Уверете се, че са приготвени буфер AW1, буфер AW2 и протеаза QIAGEN (QP) съгласно инструкциите на страници 18–21.
- Добавете носеща РНК, разтворена в буфер AVE или буфер AL, съгласно инструкциите на страница 18.

Процедура

1. **Отпипетирайте 25 µl протеаза QIAGEN (QP) в епруветка за лизиране (lysis tube, LT).**



Прочетете „Подготовка на реактиви и буфери“ на страница 18 за информация относно ресуспендирането на протеаза QIAGEN (QP) в протеазен разтворител (PS).

2. **Добавете 200 µl плазма или серум в епруветката за лизиране (LT).**
Ако обемът на пробата е по-малък от 200 µl, добавете съответен обем 0,9% разтвор на натриев хлорид, така че обемът на протеазата и пробата да стане общо до 225 µl.

3. **Добавете 200 µl буфер AL (съдържащ 28 µg/ml носеща РНК). Затворете капачката и смесете чрез пулсационно разбъркване с продължителност ≥15 секунди.**

За осигуряване на ефективно лизиране е важно пробата и буферът AL да бъдат смесени до получаване на хомогенен разтвор.



Не добавяйте протеаза QIAGEN (QP) директно в буфера AL.

4. **Инкубирайте при 56° C ± 3° C за 15 минути ± 1 минута в термостат.**
5. **Центрофугирайте кратко епруветката за лизиране (LT), за да отстраните капките от вътрешността на капачето.**
6. **Добавете 250 µl етанол (96 – 100%) към пробата, затворете капачето и смесете добре с пулсационно разбъркване за ≥ 15 секунди. Инкубирайте лизата с етанола за 5 минути ± 30 секунди на стайна температура (15 – 25° C).**



Ако стайната температура превишава 25° C, трябва да охладите етанола с лед, преди да го добавите към лизата.

7. **Центрофугирайте кратко епруветката, за да отстраните капките от вътрешността на капачето.**
8. **Внимателно въведете всички лизат от стъпка 7 в колоната QIAamp MinElute, без да намокряте ръба. Затворете капачето и центрофугирайте при приблизително 6000 x g за > 1 минута. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста епруветка за промиване (WT) 2 ml и изхвърлете епруветката за промиване, съдържаща филтрата.**

Ако след центрофугирането лизатът не е преминал напълно през колоната, центрофугирайте отново при по-висока скорост, докато колоната QIAamp MinElute се изпразни.

9. **Внимателно отворете колоната QIAamp MinElute, и добавете 500 µl буфер AW1, без да намокряте ръба. Затворете капачето и центрофугирайте при приблизително 6000 x g за ≥ 1 минута. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста епруветка за промиване (WT) 2 ml и изхвърлете епруветката за промиване, съдържаща филтрата.**
10. **Внимателно отворете колоната QIAamp MinElute и добавете 500 µl буфер AW2, без да намокряте ръба. Затворете капачето и центрофугирайте при приблизително 6000 x g за > 1 минута. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста епруветка за промиване 2 ml и изхвърлете епруветката за промиване, съдържаща филтрата.**

- 11. Внимателно отворете колоната QIAamp MinElute и добавете 500 µl етанол (96 – 100%), без да намокрите ръба. Затворете капачето и центрофугирайте при приблизително 6000 x g за > 1 минута. Изхвърлете епруветката за промиване, съдържаща филтрата.**

Пренасянето на етанол в елуата може да създаде проблеми при последващи приложения по веригата. Възможно е роторите на някои центрофуги да вибрират при забавяне, което да доведе до контакт с QIAamp MinElute на етанола в протичащата течност. Изваждането на колоната QIAamp MinElute и епруветката за промиване от ротора също може да доведе до контакт на протичащата течност с колоната.

- 12. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста епруветка за промиване (WT) 2 ml. Центрофугирайте на максимална скорост (приблизително 20 000 x g) в продължение на 3 минути ± 30 секунди, за да изсушите напълно мембраната.**
- 13. Поставете колоната QIAamp MinElute в нова епруветка за промиване (WT) 2 ml, отворете капачето и инкубирайте модула при 56° C ± 3° C за 3 минути ± 30 секунди, за да изсушите напълно мембраната.**

Тази стъпка е необходима за изпаряване на остатъчната течност.

- 14. Поставете колоната QIAamp MinElute в епруветка за елуиране (ET) и изхвърлете епруветката за промиване с филтрата. Внимателно отворете капачето на колоната QIAamp MinElute и нанесете 20 – 150 µl буфер AVE в центъра на мембраната. Затворете капачето и инкубирайте при стайна температура за 5 минути. Центрофугирайте на максимална скорост (приблизително 20 000 x g) за > 1 минута.**



Уверете се, че елуиращият буфер е достигнал стайна температура. Ако елуирането се извършва в малки обеми (< 50 µl), елуиращият буфер трябва да се нанесе в центъра на мембраната за пълно елуиране на свързаните РНК и ДНК.

Обемите на елуиране може да се променят в зависимост от изискванията на последващите приложения по веригата. Не забравяйте, че обемът на разтворения елуат ще бъде приблизително 5 µl по-малък от обема на елуиращия буфер, въведен в колоната.

Контрол на качеството

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

Ограничения

Характеристиките на системата за изолиране на вирусни нуклеинови киселини са установени чрез проби от серум и плазма.

Потребителят носи отговорност за валидиране на характеристиките на системата при процедури, използвани в лабораторията, които не се обхващат от изпитванията на QIAGEN.

За да се сведе до минимум рискът от отрицателно въздействие върху диагностичните резултати, трябва да се използват подходящи контроли за последващите приложения по веригата. За допълнително валидиране се препоръчват насоките на International Conference on Harmonization of Technical Requirements (Международна конференция по хармонизиране на техническите изисквания, ICH) в *ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Валидиране на аналитични процедури: Текст и методология)*.

Всички получени диагностични резултати трябва да се интерпретират съвместно с други клинични или лабораторни констатации.

Работни характеристики

Вижте www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance относно работните характеристики на QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Литературни източници

QIAGEN поддържа голяма и актуална онлайн база данни от научни публикации, използващи продуктите на QIAGEN. Опциите за подробно търсене ви позволяват да намирате необходимите ви статии по обикновени ключови думи или чрез посочване на приложението, изследователската област, заглавието и т.н.

За пълен списък на литературните източници посетете базата данни с литературни източници на QIAGEN онлайн на адрес www.qiagen.com/RefDB/search.asp или се свържете с отдела за техническо обслужване на QIAGEN или с местния си дистрибутор.

СИМВОЛИ



Съдържа реактиви, достатъчни за приготвяне на <N> проби



Вижте инструкциите за употреба



Използвайте до



Медицинско изделие за ин витро диагностика



Каталожен номер



Важна забележка



Партиден номер



Номер на материала



Компоненти



Обем



Температурни ограничения



Производител



При получаване



Отворете при доставка; съхранявайте колоните QIAamp MinElute при 2 – 8° C



Запишете текущата дата след добавяне на етанол в бутилката



Добавяне



Съдържа

LYOPH	Лиофилизиран
RCNS	Разтворете в
EtOH	Етанол
GuHCl	Гуанидин хидрохлорид
MALEIC ACID	Малеинова киселина
SUBT	Субтилизин
GTIN	Глобален номер на търговска единица
→	Води до

Информация за контакти

Ние в QIAGEN се гордеем с качеството и достъпността на техническата си поддръжка. В отделите ни за техническо обслужване работят опитни учени със задълбочени практически и теоретични познания по технологиите за проби и анализ, както и по използването на продуктите на QIAGEN. Ако имате въпроси или срещате затруднения с QIAamp DSP Virus Spin Kit или като цяло с продуктите на QIAGEN, моля, не се колебайте да се свържете с нас.

Клиентите на QIAGEN са главният източник на информация за напредничавата или специализираната употреба на нашите продукти. Тази информация помага на други специалисти, както и на изследователите в QIAGEN. Затова ви призоваваме да се свързвате с нас, ако имате предложения за работата на продуктите, нови приложения или техники.

За техническа помощ и повече информация вижте центъра ни за техническа поддръжка на адрес www.qiagen.com/Support или се свържете с един от отделите за техническо обслужване на QIAGEN или местните дистрибутори (вижте задната корица или посетете www.qiagen.com).

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

Приложение

Работа с РНК

Рибонуклеазите (РН-азите) са много стабилни и активни ензими, които обикновено не се нуждаят от кофактори, за да функционират. Тъй като деактивирането на РН-азите е много трудно и дори незначителни количества от тях могат да разрушат РНК, не използвайте пластмасови или стъклени изделия, без първо да елиминирате възможното замърсяване с РН-аза. Трябва да полагате усилия, за да избегнете необратимо въвеждане на РН-ази в пробата от РНК по време на процедурата по изолиране или след нея. За да създадете и поддържате среда без РН-ази, трябва да спазвате следните предпазни мерки по време на предварителната обработка и употребата на еднократни и нееднократни съдове и разтвори, докато работите с РНК.

Обща работа

При работа с РНК винаги трябва да се използва подходяща микробиологично асептична техника. По ръцете и праховите частици може да има бактерии и плесени, които са най-честите източници на замърсяване с РН-ази. Винаги носете латексни или винилови ръкавици, когато работите с реактиви и проби от РНК, за да предотвратите замърсяване с РН-ази от кожата повърхност или от прашно лабораторно оборудване. Сменяйте ръкавиците често и дръжте епруветките затворени.

Еднократни пластмасови изделия


Преди употреба еднократните пластмасови изделия трябва да се третират, за да гарантирате, че не съдържат РН-ази. Пластмасовите изделия трябва старателно да се изплакват с 0,1 M NaOH,* 1 mM EDTA* и накрая с вода без РН-ази* (вижте „Разтвори“ на страница 31). Устойчивите на хлороформ пластмасови изделия може също така да се изплакват с хлороформ* за деактивиране на РН-азите.

Стъклени изделия

Преди употреба стъклените изделия трябва да се третират, за да гарантирате, че не съдържат РН-ази. Стъклените изделия, използвани за работа с РНК, преди употреба трябва да се почистват с детергент, да се изплакват щателно и да се изпичат във фурна при > 240° C за четири или повече часа (за през нощта, ако е по-удобно).

* 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 (SDS), които може да получите от доставчика на продукта.

Само обработването в автоклав няма напълно да деактивира РН-азите. Изпичането във фурна ще деактивира рибонуклеазите и също така ще гарантира, че по повърхността на стъклени изделия няма други нуклеинови киселини (като плазмидна ДНК). Друг вариант е стъклени изделия да се третират с DEPC* (диетил пирокарбонат). Покрийте стъклени изделия с 0,1% DEPC във вода за през нощта (12 часа) при 37° C и след това обработете в автоклав или загрейте до 100° C за 15 минути, за да отстраните остатъчния DEPC.

 Епруветките Corex® трябва да се обработват против РН-ази с DEPC а не с изпичане. Това ще намали процентът на неуспех при този тип епруветки по време на центрофугиране.

Съдове за електрофореза

Съдовете за електрофореза трябва да се почистват с разтвор на детергент (напр. 0,5% SDS),* изплакват с вода, изсушават с етанол,*† след което да се напълват с разтвор на 3% водороден пероксид.* След 10 минути на стайна температура съдовете за електрофореза трябва да се изплакват щателно с вода без РН-ази.

* 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 (SDS), които може да получите от доставчика на продукта.


† Пластмасите, използвани в някои съдове за електрофореза, не са устойчиви на етанол. Вземете необходимите мерки и проверете инструкциите на доставчика.

Разтвори

Разтворите (вода и други разтвори) трябва да се третират с 0,1% DEPC. DEPC реагира с първичните амини и не може да се използва директно за третиране на трис буфери. DEPC е силно нестабилен при наличие на трис буфери и се разгражда бързо в етанол и CO₂. Когато приготвяте трис буфери, първо третирайте водата с DEPC, след което разтворете трис, за да направите съответния буфер.

DEPC е силен, но не е пълен инхибитор на РН-азите. Често се използва в концентрация 0,1% за деактивиране на РН-азите по пластмасови или стъклени изделия или за създаване на разтвори и вода без РН-ази. DEPC деактивира РН-азите чрез промяна на ковалентните връзки. Много малки количества DEPC променят пуриновите остатъци в РНК чрез карбетоксилиране. Карбетоксилираната РНК се транслира с много ниска ефикасност в системи без клетки. Способността ѝ да образува хибриди ДНК:РНК или РНК:РНК обаче не намалява особено, освен ако не се промени голяма част от пуриновите остатъци. Остатъчният DEPC винаги трябва да се отстранява от разтворите или съдовете чрез обработване с автоклав или нагриване до 100° C ± 3° C за 15 минути ± 1 минута.

Добавете 0,1 ml DEPC в 100 ml от разтвора, който трябва да се третира, и разклатете енергично, за да смесите DEPC с разтвора, или инкубирайте разтвора за > 12 часа при 37° C ± 3° C. Обработете с автоклав за 15 минути ± 1 минута, за да отстраните остатъците от DEPC. Може да бъде желателно да тествате източниците на вода за наличие на замърсяващи РН-ази, тъй като в много източници на дестилирана вода няма активност на РН-ази.

 Буферите от QIAamp DSP Virus Spin Kit не са обработени срещу РН-ази чрез DEPC и следователно в тях няма замърсяване с DEPC.

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

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.

Ограничено лицензионно споразумение за QIAamp DSP Virus Spin Kit

Използването на този продукт означава, че лицата, закупили или използващи QIAamp DSP Virus Spin Kit, приемат следните условия:

1. QIAamp DSP Virus Spin Kit може да се използва само в съответствие с *Ръководството на QIAamp DSP Virus Spin Kit* и само с компонентите, съдържащи се 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 *Ръководството на QIAamp DSP Virus Spin Kit* и допълнителните протоколи, налични на адрес www.qiagen.com.
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.

© 2015 QIAGEN, всички права запазени.

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

