

# QIAamp® DSP Virus Spin Kit Handbuch



Version 1



Für in-vitro-diagnostische Anwendungen



61704



1062686DE



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

R6



1062686DE



## **QIAGEN Sample and Assay Technologies**

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

### **QIAGEN setzt Standards in:**

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

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

# **Inhalt**

<b>Vorgesehener Verwendungszweck</b>	<b>4</b>
<b>Kurze Zusammenfassung des Verfahrens</b>	<b>4</b>
<b>Das QIAamp Prinzip und seine Anwendung</b>	<b>4</b>
Automatisierte Reinigung viraler Nukleinsäuren mit dem QIAcube	4
<b>Mit dem Kit gelieferte Materialien</b>	<b>9</b>
Kit-Inhalt	9
<b>Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien</b>	<b>10</b>
<b>Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen</b>	<b>11</b>
<b>Lagerung und Handhabung der Reagenzien</b>	<b>13</b>
<b>Lagerung und Handhabung der Proben</b>	<b>13</b>
<b>Durchführung der Nukleinsäure-Reinigung</b>	<b>14</b>
Wichtige Hinweise vor Beginn	14
Handhabung der QIAamp MinElute Spinsäulen	14
Zentrifugation	15
Zentrifugieren der QIAamp MinElute Spinsäulen	15
Vorbereitung der Reagenzien und Puffer	16
<b>Protokoll: Reinigung viraler Nukleinsäuren aus Plasma oder Serum</b>	<b>20</b>
<b>Qualitätskontrolle</b>	<b>23</b>
<b>Einschränkungen</b>	<b>23</b>
<b>Leistungscharakteristik</b>	<b>23</b>
<b>Literatur</b>	<b>23</b>
<b>Symbole</b>	<b>24</b>
<b>Kontaktinformationen</b>	<b>25</b>
<b>Anhang</b>	<b>26</b>

## **Vorgesehener Verwendungszweck**

Der QIAamp DSP Virus Spin Kit ist ein System, das auf der Silicamembran-Technologie (der QIAamp Technologie) für die Isolierung und Reinigung viraler Nukleinsäuren aus biologischen Probenmaterialien basiert.

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

Der QIAamp DSP Virus Spin Kit ist für in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen.

## **Kurze Zusammenfassung des Verfahrens**

Beim QIAamp DSP Virus Spin Kit wird die langjährig bewährte Technologie für die gleichzeitige Isolierung von viraler DNA und RNA angewendet. Der Kit kombiniert die selektiven Bindungseigenschaft einer Silicamembran mit flexiblen Elutionsvolumina zwischen 20 und 150 µl. Das Verfahren ist für Plasma und Serum als Ausgangsmaterial geeignet. Es können frisch gewonnene oder eingefrorene Proben verwendet werden, vorausgesetzt sie wurden nicht mehr als einmal eingefroren und wiederaufgetaut (siehe Seite 13). Die viralen Nukleinsäuren werden in Puffer AVE eluiert und können direkt in Amplifikationsreaktionen eingesetzt oder bei –25 °C bis –15 °C gelagert werden.

## **Das QIAamp Prinzip und seine Anwendung**

Das QIAamp DSP Virus Spin-Protokoll besteht prinzipiell aus vier Schritten (Lysieren, Binden, Waschen, Eluieren) und wird mithilfe der QIAamp MinElute® Spinsäulen entweder in einer Standard-Tischzentrifuge oder automatisiert im QIAcube® durchgeführt. Das Verfahren wurde gezielt entwickelt, um die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzkontamination zwischen Proben zu minimieren, und ermöglicht die sichere Handhabung von potenziell infektiösen Proben. Das einfache QIAamp DSP Virus-Spin-Protokoll ist für die gleichzeitige Verarbeitung mehrerer Proben geeignet. Der QIAamp DSP Virus Spin Kit kann für die Isolierung von viraler RNA und DNA aus verschiedensten RNA- und DNA-Viren benutzt werden. Allerdings wurde nicht für jede Virus-Spezies die Leistungscharakteristik des Kits bestimmt; sie ist vielmehr vom Anwender zu validieren.

## **Automatisierte Reinigung viraler Nukleinsäuren mit dem QIAcube**

Die Reinigung viraler Nukleinsäuren mithilfe des QIAamp DSP Virus Spin Kits kann mit dem QIAcube voll automatisiert werden. Der innovative QIAcube verwendet hochmoderne Technologien bei der Verarbeitung der Proben in den

QIAGEN® Spinsäulen; damit lässt sich die automatisierte Probenvorbereitung bei niedrigem Durchsatz nahtlos in Ihren Labor-Arbeitsablauf integrieren. Die Probenverarbeitung mit dem QIAcube erfolgt nach denselben Arbeitsschritten wie beim manuellen Protokoll (d. h. Lysieren, Binden, Waschen und Eluieren), sodass Sie dafür den QIAamp DSP Virus Spin Kit zur Reinigung qualitativ hochwertiger Virus-Nukleinsäuren verwenden können.

Bei der automatisierten Probenverarbeitung mit dem QIAcube unter Verwendung des QIAamp DSP Virus Spin Kits kann das Gerät – wegen der Totvolumina, Verdunstung und des zusätzlichen Reagenzienverbrauchs durch das automatisierte Pipettieren – eventuell auch nur weniger als 50 Proben verarbeiten. QIAGEN garantiert nur für die manuelle Durchführung mit dem QIAamp DSP Virus Spin Kit, dass 50 Proben verarbeitet werden können.

Weitere Informationen über das automatisierte Verfahren finden Sie im entsprechenden Protokollblatt, das unter [www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube) zur Verfügung steht. Aktualisierte Protokollblätter können kostenfrei heruntergeladen werden oder können beim Technischen Service von QIAGEN (siehe Seite 25) angefordert werden.



**Abbildung 1. Der QIAcube.**

### **Lyse mit QIAGEN Protease**

Die Proben werden unter stark denaturierenden Bedingungen bei erhöhten Temperaturen lysiert. Die Lyse erfolgt in Gegenwart von QIAGEN Protease und Puffer AL; beide Komponenten zusammen gewährleisten die Inaktivierung von RNasen.

### **Adsorption an die QIAamp MinElute Membran**

Die Bindungsbedingungen werden durch den Zusatz von Ethanol eingestellt, um eine optimale Bindung der viralen RNA und DNA an die Membran zu ermöglichen. Das Lysat wird dann in eine QIAamp MinElute Spinsäule überführt, wo die viralen Nukleinsäuren bei der Zentrifugation des Lysats an die Silicagel-Membran adsorbieren. Salz und pH-Bedingungen im Lysat stellen sicher, dass weder Proteine noch andere Kontaminationen, die eine anschließende PCR oder andere enzymatische Nachweisreaktionen hemmen könnten, auf der QIAamp MinElute Membran zurückgehalten werden.

Während der Beladungs- und Waschschrte werden die QIAamp MinElute Säulen in die mitgelieferten 2-ml-Waschröhrchen gestellt.

### **Entfernen verbliebener Kontaminationen**

Die Nukleinsäuren bleiben an der Membran gebunden, während eventuell verbliebene Kontaminanten in drei Waschschrten effizient ausgewaschen und entfernt werden. Hochreine virale RNA und DNA werden in einem einzigen Schritt mit Puffer AVE, der auf Raumtemperatur äquibriert ist, eluiert.

### **Elution reiner Nukleinsäuren**

Zur Elution wird Puffer AVE verwendet. Die QIAamp MinElute Spinsäulen ermöglichen ein geringes Elutionsvolumen von lediglich 20 µl. Ein niedriges Elutionsvolumen ergibt ein Eluat, das Nukleinsäuren in hoher Konzentration enthält.

Bei nachfolgenden Applikationen, die ein kleines Ausgangsvolumen erfordern (z. B. einige PCR- oder RT-PCR-Assays) kann ein konzentrierteres Eluat die Empfindlichkeit des Assays eventuell erhöhen.

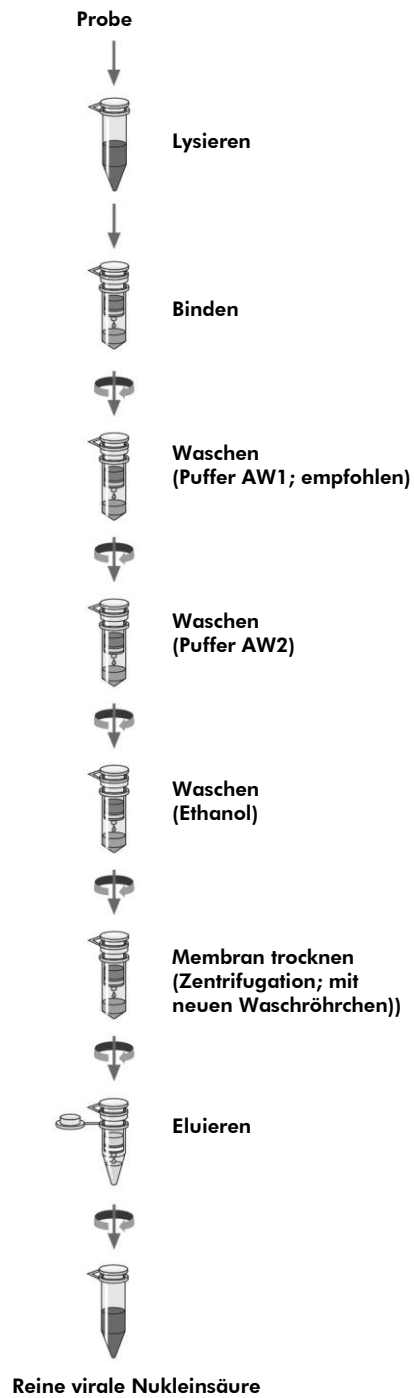
Für Folgeanwendungen, bei denen dagegen ein größeres Ausgangsvolumen eingesetzt wird, kann das Elutionsvolumen auf bis zu 150 µl erhöht werden. Allerdings reduziert sich bei Erhöhung des Elutionsvolumens die Konzentration an Nukleinsäuren im Eluat.

Das wiedergefundene Eluatvolumen kann um bis zu 5 µl kleiner sein als das auf die Spinsäule aufgetragene Volumen Elutionspuffer; beispielsweise ergibt ein Elutionspuffervolumen von 20 µl ein endgültiges Eluatvolumen von 15–20 µl. Das wiedergefundene Eluatvolumen hängt von der Art der Probe ab.

Die eluierte Nukleinsäure wird in 1,5-ml-Elutionsgefäßen (ET, im Kit mitgeliefert) aufgefangen. Die Lagerung der DNA oder RNA sollte bei –20 °C erfolgen.

Die Ausbeuten, die bei der Isolierung viraler Nukleinsäure aus biologischen Proben erhalten werden, liegen normalerweise unter 1 µg. Für die Ausbeutebestimmung werden quantitative Amplifikationsmethoden empfohlen. Beachten Sie bei der Quantifizierung der nach dem QIAamp DSP Virus Spin-Protokoll gereinigten Nukleinsäuren, dass die Probe erheblich mehr Carrier-RNA als virale RNA enthält.

## QIAamp DSP Virus Spin-Protokoll



Vollständig automatisiert im QIAcube

## **Carrier-RNA**

Die verwendete Carrier-RNA dient zwei Zwecken. Zum einen verbessert sie die Bindung der viralen Nukleinsäuren an die QIAamp Membran, insbesondere wenn die Probe nur sehr wenig Zielmoleküle (Targets) enthält. Zum anderen wird durch den Zusatz von relativ großen Mengen Carrier-RNA die Wahrscheinlichkeit eines Abbaus der Virus-RNA reduziert – für den seltenen Fall, dass durch die chaotropen Salze und das Detergens im Puffer AL RNasen nicht denaturiert wurden. Wird keine Carrier-RNA zum Puffer AL gegeben, kann dies zu einer geringeren Wiederfindung der viralen RNA oder DNA führen.

Die Effizienz des Amplifikationssystems variiert in Abhängigkeit von der Gesamtmenge an Nukleinsäure, die im Reaktionsansatz vorhanden ist. Die mit diesem Kit erhaltenen Eluate enthalten sowohl virale Nukleinsäuren als auch Carrier-RNA; dabei übersteigt die Menge an Carrier-RNA die Menge der viralen Nukleinsäuren bei Weitem. Das Volumen an Eluat, das in einer nachfolgenden Amplifikationsreaktion eingesetzt wird, sollte daher auf der Basis der Carrier-RNA-Menge im Eluat berechnet werden. Um eine möglichst hohe Sensitivität in der Amplifikationsreaktion zu erzielen, kann es notwendig sein, die Menge Carrier-RNA, die zum Puffer AL hinzugegeben wird, zu variieren.

## **Zugabe interner Kontrollen**


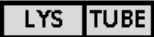










Wenn das QIAamp DSP Virus Spin-Protokoll in Kombination mit kommerziell erhältlichen Amplifikationssystemen verwendet wird, kann es erforderlich sein, eine interne Kontrolle bei der Reinigungsmethode mitzuführen. Eine als interne Kontrolle verwendete RNA oder DNA sollte zusammen mit der Carrier-RNA zum Lysepuffer gegeben werden. Für eine optimale Effizienz der Reinigung sollten die Moleküle der internen Kontrolle länger als 200 Nukleotide sein, da kleinere Moleküle nicht effizient wiedergefunden werden.

Lesen Sie die Anweisungen des Herstellers, um die optimale Konzentration zu bestimmen. Die Verwendung einer anderen Konzentration als die empfohlene kann zu einer verminderten Amplifikationseffizienz führen.



# Mit dem Kit gelieferte Materialien

## Kit-Inhalt

QIAamp DSP Virus Spin Kit			
<b>Katalog-Nr.</b>		<b>61704</b>	
<b>Anzahl Präparationen</b>		<b>50<sup>§</sup></b>	
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (2 ml) (QIAamp MinElute Spinsäulen mit 2-ml-Waschröhrchen)		50
LT	Lysis Tubes (Lysegefäße) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Elutionsgefäße) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Waschröhrchen) (2 ml)		5 x 50
AL	Lysis Buffer* (Lysepuffer)		33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (Waschpuffer 1 [Konzentrat])		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 <sup>†</sup> (concentrate) (Waschpuffer 2 [Konzentrat])		13 ml
AVE	Elution Buffer <sup>‡</sup> (purple caps) (Elutionspuffer [violette Deckel])		4 x 2 ml
PS	Protease Solvent <sup>‡</sup> (Protease-Lösungsmittel)		4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (red caps) (Carrier-RNA [rote Deckel])		310 µg
QP	QIAGEN Protease <sup>‡</sup>		1 Fläschchen
	Handbuch		1

\* Enthält ein chaotropes Salz. Bitte beachten Sie die im Labor üblichen Vorsichtsmaßnahmen und tragen Sie beim Umgang mit dieser Substanz Laborhandschuhe. Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Chlorbleiche (Natriumhypochlorit, NaOCl) enthalten. Auf Seite 11 finden Sie weitere Sicherheitshinweise.

<sup>†</sup> Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

<sup>‡</sup> Siehe „Vorbereitung der Reagenzien und Puffer“ auf Seite 16.

<sup>§</sup> Bei der automatisierten Probenverarbeitung mit dem QIAcube unter Verwendung des QIAamp DSP Virus Spin Kits kann das Gerät – wegen der Totvolumina, Verdunstung und des zusätzlichen Reagenzienverbrauchs durch das automatisierte Pipettieren – eventuell auch nur weniger als 50 Proben verarbeiten. QIAGEN garantiert nur für die manuelle Durchführung mit dem QIAamp DSP Virus Spin Kit, dass 50 Proben verarbeitet werden können.

## Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (*safety data sheets*, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

- Ethanol (96–100 %)\*
- Pipetten<sup>†</sup> und Pipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir dringend, Pipettenspitzen mit Aerosolbarriere zu benutzen)
- Heizblock<sup>†</sup> für die Lyse der Proben bei 56 °C
- Tischzentrifuge<sup>†</sup> (mit Rotor für 1,5-ml- und 2-ml-Reaktionsgefäße)
- Laborschüttler (Vortex)
- Für Probenvolumina < 200 µl: 0,9 % NaCl-Lösung

\* Verwenden Sie keinen vergällten Alkohol, der andere Substanzen, wie z. B. Methanol oder Methylethylketon, enthält.

<sup>†</sup> Stellen Sie sicher, dass die Geräte (z. B. Pipetten und Heizblock) regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft und kalibriert werden, damit die ordnungsgemäße Verarbeitung der Proben nach dem QIAamp DSP Virus Spin-Protokoll gewährleistet ist.

# Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen (*safety data sheets*, SDSs). In unserer Online-Sammlung der Sicherheitsdatenblätter unter [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety) finden Sie zu jedem QIAGEN Kit und zu jeder Kit-Komponente das jeweilige SDS als PDF-Datei, die Sie einsehen und ausdrucken können.



**WARNUNG: GEBEN SIE KEINE Chlorbleiche oder saure Lösungen direkt in den Flüssigabfall, der Puffer AL oder Puffer AW1 enthält.**

Puffer AL und Puffer AW1 enthalten Guanidinhydrochlorid, die hoch reaktive Verbindungen bilden können, wenn sie mit Chlorbleiche zusammengebracht werden. Wenn eine Flüssigkeit, die einen oder mehrere dieser Puffer enthält, verschüttet wird, reinigen Sie die betroffenen Flächen mit einem geeigneten Labordetergens und Wasser. Enthält die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Agenzien, reinigen Sie die Fläche zuerst mit Detergens und Wasser, danach mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit.

Tragen Sie bei der Entsorgung von beschädigten oder undichten Pufferflaschen Handschuhe und Schutzbrille, um eine persönliche Verletzung oder Verletzungsgefahr für andere zu vermeiden.

Der während des QIAamp DSP Virus Spin-Protokolls anfallende Flüssigabfall ist von QIAGEN nicht auf eventuell noch vorhandenes infektiöses Material getestet worden. Eine Kontamination des Flüssigabfalls mit Resten infektiösen Materials ist äußerst unwahrscheinlich, kann jedoch nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Behandeln Sie den Flüssigabfall daher als potenziell infektiös und werfen Sie ihn gemäß den anzuwendenden Sicherheitsbestimmungen.

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

Die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise gelten für einzelne Komponenten des QIAamp DSP Virus Spin Kit:

### **Puffer AL**



Enthält: Guanidinhydrochlorid; Maleinsäure. Warnung! Kann beim Verschlucken oder beim Einatmen gesundheitsschädlich sein. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Bei fortbestehender Augenreizung: Arzt hinzuziehen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung/ Schutzhandschuhe/ Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen.

### **Puffer AW1**



Enthält: Guanidinhydrochlorid. Warnung! Gesundheitsschädlich beim Verschlucken oder beim Einatmen. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Bei Unwohlsein GIFTNOTRUF anrufen oder Arzt hinzuziehen. Inhalt/ Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor Wiederverwendung waschen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung/ Schutzhandschuhe/ Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen.

### **QIAGEN Protease**



Enthält: Subtilisin. Gefahr! Verursacht leichte Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. Kann beim Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Einatmen von Staub/ Rauch/ Gas/ Nebel/ Dämpfen/ Aerosol vermeiden. Inhalt/ Behälter bei zugelassenem Abfallentsorgungsdienst entsorgen. Bei Auftreten von Atmungssymptomen: GIFTNOTRUF anrufen oder Arzt hinzuziehen. IM AUGE: Vorsichtig mehrere Minuten lang mit Wasser spülen. Falls vorhanden und leicht möglich, Kontaktlinsen entfernen. Spülen fortsetzen. BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden betroffene Person an frische Luft bringen und in einer zum Atmen bequemen Position ruhen lassen. Sofort GIFTNOTRUF anrufen oder Arzt hinzuziehen. Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung/ Schutzhandschuhe/ Schutzbrille/ Gesichtsschutz tragen. Atemschutz tragen.

## **Lagerung und Handhabung der Reagenzien**

QIAamp MinElute Spinsäulen sollten nach Anlieferung bei 2–8 °C gelagert werden.

Alle Puffer können bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufbewahrt werden.

Die lyophilisierte Carrier-RNA ist bei Raumtemperatur (15–25 °C) mindestens bis zum Haltbarkeitsdatum auf der Kit-Verpackung stabil. Die Carrier-RNA kann nur in Puffer AVE aufgelöst werden; die gelöste Carrier-RNA sollte sofort zum Puffer AL gegeben werden, wie auf Seite 16 beschrieben. Diese Lösung sollte frisch angesetzt werden; bei 2–8 °C ist sie für bis zu 48 Stunden stabil. Nicht gebrauchte Mengen der in Puffer AVE gelösten Carrier-RNA sollten in Aliquots bei –30 °C bis –15 °C eingefroren werden.

Die lyophilisierte QIAGEN Protease (QP) kann bei Raumtemperatur (15–25 °C) mindestens bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum gelagert werden, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Funktion kommt.

In Protease-Lösungsmittel (PS) rekonstituierte QIAGEN Protease (QP) ist bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu ein Jahr, höchstens jedoch bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum, stabil. Ein längeres Stehenlassen der QIAGEN Protease-Stammlösung bei Raumtemperatur sollte vermieden werden.

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

## **Lagerung und Handhabung der Proben**

Nach Blutentnahme und Zentrifugation können Plasma- und Serumproben bis zu 6 Stunden bei 2–8 °C aufbewahrt werden. Für die Langzeitlagerung wird empfohlen, die Proben in Aliquots bei –20 °C oder –80 °C einzufrieren. Tiefgefrorene Plasma- oder Serumproben dürfen nur einmal aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen führt zur Denaturierung und Präzipitation von Proteinen, was wiederum zu verminderten Virustitern und reduzierter Ausbeute an viraler Nukleinsäure führt. Außerdem können Kryopräzipitate, die sich beim Einfrieren und Auftauen bilden, die QIAamp MinElute Membran verstopfen. Wenn sich sichtbare Kryopräzipitate in den Proben befinden, zentrifugieren Sie sie für 3 Minuten bei 6800 x g und überführen Sie den Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß, ohne das Pellet aufzuwirbeln.

# Durchführung der Nukleinsäure-Reinigung

## Wichtige Hinweise vor Beginn

- Überprüfen Sie alle Kit-Komponenten auf Beschädigung, nachdem Sie den Kit bekommen haben. Falls die Blisterverpackungen oder die Pufferflaschen beschädigt sind, kontaktieren Sie bitte den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren lokalen Distributor. Für den Fall, dass Flüssigkeit ausgetreten ist oder verschüttet wurde, lesen Sie bitte den Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“ (auf Seite 11). Verwenden Sie keine beschädigten Kit-Komponenten, da dies zu einer reduzierten Leistungsfähigkeit des Kits führen könnte.
- Verwenden Sie immer RNase-freie Geräte und Hilfsmittel.
- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten immer die Pipettenspitzen. Um das Risiko von Kreuzkontaminationen zu minimieren, empfehlen wir, Pipettenspitzen mit integriertem Filter (als Aerosolbarriere) zu benutzen.
- Alle Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt.
- Tragen Sie immer Einmal-Handschuhe und kontrollieren Sie regelmäßig, dass sie nicht mit Probenmaterial verunreinigt sind. Verwerfen Sie die Handschuhe, wenn sie kontaminiert sind.
- Öffnen Sie jeweils immer nur ein Reaktionsgefäß, um das Risiko von Kreuzkontaminationen zu minimieren.
- Verwenden Sie zusammen mit den Kits, die Sie aktuell benutzen, keine Komponenten aus anderen Kits, es sei denn die Chargennummern sind identisch.
- Vermeiden Sie eine mikrobielle Kontamination der Kit-Reagenzien.
- Um die Sicherheit im Umgang mit potenziell infektiösem Material sicherzustellen, empfehlen wir, unter einer laminaren Luftströmung zu arbeiten, bis die Proben lysiert sind.
- Dieser Kit sollte nur von Personen verwendet werden, die in in-vitro-diagnostischer Laborpraxis geschult sind.

## Handhabung der QIAamp MinElute Spinsäulen

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

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

## **Zentrifugation**

- Alle für die Zentrifugationsschritte benötigten Waschröhrchen und Elutionsgefäße werden mit dem Kit geliefert.
- Die Zentrifugation der QIAamp MinElute Spinsäulen erfolgt bei ca. 6000 x g, um die Geräuschbelastung durch die Zentrifuge zu reduzieren. Ein Zentrifugieren bei maximaler Drehzahl hat keinen Einfluss auf die DNA- oder RNA-Ausbeute.
- Die Zentrifugation zum Trocknen der Membran am Ende der Waschprozedur und zum Eluieren sollte jeweils bei maximaler Drehzahl durchgeführt werden.
- Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt werden.

## **Zentrifugieren der QIAamp MinElute Spinsäulen**

- Verschließen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule, bevor Sie sie in die Tischzentrifuge einsetzen. Zentrifugieren Sie wie in den einzelnen Protokollschritten angegeben.
- Entnehmen Sie anschließend die QIAamp MinElute Spinsäule zusammen mit dem Waschröhrchen aus der Tischzentrifuge.
- Setzen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule in ein neues Waschröhrchen. Verwerfen Sie das Filtrat und das Waschröhrchen. Bitte beachten Sie, dass das Filtrat eventuell gefährlichen Flüssigabfall enthalten kann und sachgemäß zu entsorgen ist.
- Öffnen Sie vorsichtig immer nur eine QIAamp MinElute Spinsäule und vermeiden Sie Aerosolbildung.

Für eine effiziente Parallelverarbeitung mehrerer Proben empfehlen wir, vorab ein Rack mit Waschröhrchen zu befüllen, sodass die QIAamp MinElute Spinsäulen nach der Zentrifugation dort hineingesetzt werden können. Gebrauchte Waschröhrchen mit Filtrat können verworfen und die neuen Waschröhrchen mit den QIAamp MinElute Spinsäulen direkt in die Tischzentrifuge eingesetzt werden.

## Vorbereitung der Reagenzien und Puffer

### ■ RNA-Präparation

Wenn virale RNA präpariert wird, sollten Sie die manuellen Arbeitsschritte zügig durchführen; lesen Sie den Anhang auf Seite 26, bevor Sie mit der Präparation beginnen.

### ■ Vorbereitung der QIAGEN Protease

Geben Sie den gesamten Inhalt des Fläschchens mit 4,4 ml Protease Solvent (PS) in das Fläschchen mit lyophilisierter QIAGEN Protease (QP) und mischen Sie vorsichtig. Vermeiden Sie Schaumbildung, indem Sie das Fläschchen mehrere Male umdrehen. Vergewissern Sie sich, dass die QIAGEN Protease (QP) vollständig gelöst ist.



Geben Sie die QIAGEN Protease (QP) nicht direkt zum Puffer AL.\*

In Protease-Lösungsmittel (PS) rekonstituierte QIAGEN Protease (QP) ist bei Lagerung bei 2–8 °C bis zu ein Jahr, höchstens jedoch bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum, stabil. Ein längeres Stehenlassen der QIAGEN Protease-Stammlösung bei Raumtemperatur sollte vermieden werden.

### ■ Zugabe von Carrier-RNA zu Puffer AL.\*

Pipettieren Sie 310 µl Puffer AVE in das Röhrchen mit 310 µg lyophilisierte Carrier-RNA, sodass eine Lösung mit 1 µg/µl erhalten wird. Lösen Sie die Carrier-RNA gründlich, teilen Sie die Lösung in geeignete Aliquots und lagern Sie sie bei –25 °C bis –15 °C. Die Carrier-RNA-Aliquots dürfen nicht mehr als dreimal eingefroren und wiederaufgetaut werden.



Carrier-RNA löst sich nicht in Puffer AL. Sie muss zuerst in Puffer AVE aufgelöst und dann zu Puffer AL pipettiert werden.

\* Enthält ein chaotropes Salz. Bitte beachten Sie die im Labor üblichen Vorsichtsmaßnahmen und tragen Sie beim Umgang mit dieser Substanz Laborhandschuhe. Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Chlorbleiche (Natriumhypochlorit, NaOCl) enthalten. Auf Seite 11 finden Sie weitere Sicherheitshinweise.



Berechnen Sie das Volumen des Puffer-AL-Carrier-RNA-Gemischs, das pro Proben-Charge benötigt wird. Entnehmen Sie dazu die Anzahl der gleichzeitig verarbeiteten Proben der Tabelle 1 auf Seite 18. Bei einer größeren Probenanzahl können Sie die Volumina mithilfe der folgenden Beispielkalkulation berechnen.

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

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

Darin ist: **n** = Anzahl der gleichzeitig verarbeiteten Proben

**y** = berechnetes Volumen Puffer AL

**z** = Volumen Carrier-RNA-Puffer-AVE-Lösung, das zu Puffer AL pipettiert werden muss

Mischen Sie vorsichtig durch 10-maliges Umdrehen des Röhrchens. Mischen Sie nicht auf einem Vortex-Schüttler, um Schaumbildung zu vermeiden.

**Tabelle 1. Für spezifische Probenanzahlen benötigte Volumina Puffer AL und Carrier-RNA-Puffer-AVE-Gemisch für das QIAamp DSP Virus-Spin-Protokoll**

Anzahl Proben	Vol. Puffer AL (ml)	Vol. Carrier-RNA-AVE-Gemisch (µl)	Anzahl Proben	Vol. Puffer AL (ml)	Vol. Carrier-RNA-AVE-Gemisch (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



Das Probenverarbeitungs-Protokoll ist auf eine Menge von 5,6 µg Carrier-RNA pro Probe optimiert. Falls sich weniger Carrier-RNA als besser für Ihr Amplifikationssystem erwiesen hat, geben Sie nur diese erforderliche Menge an gelöster Carrier-RNA in die Röhrchen mit Puffer AL. Für jedes Mikrogramm Carrier-RNA, das pro Präparation benötigt wird, pipettieren Sie 5 µl Carrier-RNA (in Puffer AVE gelöst) pro Milliliter Puffer AL hinzu. Der Gebrauch von weniger als 5,6 µg Carrier-RNA pro Probe muss für jeden speziellen Probenotyp und jeden nachfolgenden Assay validiert werden.

### **Puffer AW1\***

Geben Sie, wie auf der Flasche beschrieben, 25 ml Ethanol (96–100 %) in eine Flasche mit 19 ml des Puffer-AW1-Konzentrats. Kreuzen Sie das Kontrollkästchen auf dem Etikett an, um zu protokollieren, dass Ethanol hinzugefügt wurde. Lagern Sie den rekonstituierten Puffer AW1 bei Raumtemperatur (15–25 °C). Rekonstituierter Puffer AW1 ist bei Raumtemperatur bis zu ein Jahr, höchstens jedoch bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum, haltbar.

 Mischen Sie den rekonstituierten Puffer AW1 durch Schütteln, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen.

### **Puffer AW2†**

Geben Sie, wie auf der Flasche beschrieben, 30 ml Ethanol (96–100 %) in eine Flasche mit 13 ml des Puffer-AW2-Konzentrats. Kreuzen Sie das Kontrollkästchen auf dem Etikett an, um zu protokollieren, dass Ethanol hinzugefügt wurde. Lagern Sie den rekonstituierten Puffer AW2 bei Raumtemperatur (15–25 °C). Rekonstituierter Puffer AW2 ist bei Raumtemperatur bis zu ein Jahr, höchstens jedoch bis zu dem auf der Kit-Verpackung angegebenen Haltbarkeitsdatum, haltbar.

 Mischen Sie den rekonstituierten Puffer AW2 durch Schütteln, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen.

### **Elution der Nukleinsäuren**

Der Elutionspuffer sollte auf Raumtemperatur äquilibriert sein, bevor er auf die Spinsäule gegeben wird.

\* Enthält ein chaotropes Salz. Bitte beachten Sie die im Labor üblichen Vorsichtsmaßnahmen und tragen Sie beim Umgang mit dieser Substanz Laborhandschuhe. Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Chlorbleiche (Natriumhypochlorit, NaOCl) enthalten. Auf Seite 11 finden Sie weitere Sicherheitshinweise.

† Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

# Protokoll: Reinigung viraler Nukleinsäuren aus Plasma oder Serum

Dieses Protokoll dient der Reinigung viraler Nukleinsäuren aus 200 µl Plasma oder Serum unter Verwendung des QIAamp DSP Virus Spin Kits und einer Tischzentrifuge. Für die automatisierte Reinigung unter Verwendung des QIAamp DSP Virus Spin Kits mit dem QIAcube, siehe das *QIAcube User Manual* und das betreffende Protokollblatt.

## **Wichtiger Hinweis vor Beginn**


- Alle Zentrifugationsschritte werden bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchgeführt.

## **Weitere wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen**

- Äquilibrieren Sie die Proben auf Raumtemperatur (15–25 °C).
- Äquilibrieren Sie Puffer AVE auf Raumtemperatur für die Elution in Schritt 14.
- Temperieren Sie für Schritt 4 einen Heizblock auf 56 °C ± 3 °C.
- Vergewissern Sie sich, dass Puffer AW1, Puffer AW2 und QIAGEN Protease (QP) gemäß den Anweisungen auf den Seiten 16–19 vorbereitet wurden.
- Geben Sie gemäß den Anweisungen auf Seite 16 f. die in Puffer AVE rekonstituierte Carrier-RNA zum Puffer AL.

## **Durchführung**

### **1. Pipettieren Sie 25 µl QIAGEN Protease (QP) in ein Lysegefäß (LT).**

 Im Abschnitt „Vorbereitung der Reagenzien und Puffer“ auf Seite 16 finden Sie Informationen zum Resuspendieren der QIAGEN Protease (QP) im Protease-Lösungsmittel (PS).

### **2. Geben Sie 200 µl Plasma- oder Serumprobe in das Lysegefäß (LT).**

Falls das Probenvolumen kleiner als 200 µl ist, pipettieren Sie das entsprechende Volumen 0,9%ige Kochsalzlösung hinzu, um das gemeinsame Volumen von Protease und Probe auf insgesamt 225 µl zu bringen.

### **3. Geben Sie 200 µl Puffer AL (enthält 28 µg Carrier-RNA/ml). Schließen Sie den Deckel und durchmischen Sie den Ansatz für ≥ 15 Sekunden auf einem Vortex-Laborschüttler.**

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



Geben Sie die QIAGEN Protease (QP) nicht direkt zum Puffer AL.

4. Inkubieren Sie für 15 Minuten  $\pm$  1 Minute in einem Heizblock bei 56 °C  $\pm$  3 °C.
5. Zentrifugieren Sie das Lysegefäß (LT) kurz, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
6. Geben Sie 250 µl Ethanol (96–100 %) zur Probe, schließen Sie den Deckel und mischen Sie wieder gründlich für  $\geq$  15 Sekunden auf einem Vortex-Laborschüttler. Inkubieren Sie das Lysat mit dem Ethanol für 5 Minuten  $\pm$  30 Sekunden bei Raumtemperatur (15–25 °C).



Falls die Umgebungstemperatur über 25 °C ist, sollte das Ethanol auf Eis gekühlt werden, bevor es zum Lysat gegeben wird.

7. Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen und Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
8. Geben Sie das Lysat aus Schritt 7 vorsichtig – ohne den oberen Rand zu benetzen – auf die QIAamp MinElute Spinsäule. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie für  $\geq$  1 Minute bei ca. 6000 x g. Setzen Sie anschließend die QIAamp MinElute Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen (WT) als Auffanggefäß und werfen Sie das benutzte Auffanggefäß mitsamt Filtrat.

Falls das Lysat die QIAamp MinElute nach der Zentrifugation nicht vollständig passiert haben sollte, zentrifugieren Sie noch einmal mit höherer Drehzahl, bis die QIAamp MinElute Spinsäule leer ist.

9. Öffnen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule vorsichtig und geben Sie 500 µl Puffer AW1 hinzu, ohne den oberen Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie für  $\geq$  1 Minute bei ca. 6000 x g. Setzen Sie anschließend die QIAamp MinElute Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen (WT) als Auffanggefäß und werfen Sie das benutzte Auffanggefäß mitsamt Filtrat.
10. Öffnen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule vorsichtig und geben Sie 500 µl Puffer AW2 hinzu, ohne den oberen Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie für  $\geq$  1 Minute bei ca. 6000 x g. Setzen Sie anschließend die QIAamp MinElute Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen (WT) als Auffanggefäß und werfen Sie das benutzte Auffanggefäß mitsamt Filtrat.
11. Öffnen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule vorsichtig und geben Sie 500 µl Ethanol (96–100 %) hinzu, ohne den oberen Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie für

**$\geq 1$  Minute bei ca. 6000 x g. Verwerfen Sie das benutzte Auffanggefäß mitsamt Filtrat.**

Eine Ethanol-Verschleppung in das Eluat könnte Probleme bei nachfolgenden Applikationen verursachen. Bei einigen Zentrifugenrotoren kann es beim Bremsvorgang zu Vibrationen kommen, was wiederum dazu führen kann, dass der Ethanol enthaltende Durchfluss in Kontakt mit der QIAamp MinElute Spinsäule kommt. Gleiches kann auch passieren, wenn man QIAamp MinElute Spinsäule und Waschröhrchen aus dem Rotor entnimmt.

**12. Setzen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen (WT). Zentrifugieren Sie für 3 Minuten  $\pm$  30 Sekunden bei maximaler Drehzahl (ca. 20 000 x g), um die Membran vollständig zu trocknen.**

**13. Setzen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule in ein neues 2-ml-Waschröhrchen (WT), öffnen Sie den Deckel und inkubieren Sie sie für 3 Minuten  $\pm$  30 Sekunden bei 56 °C  $\pm$  3 °C, um die Membran vollständig zu trocknen.**

Dieser Schritt dient der Verdunstung sämtlicher eventuell verbliebener Flüssigkeitsreste.

**14. Setzen Sie anschließend die QIAamp MinElute Spinsäule in ein Elutionsgefäß (ET) und werfen Sie das benutzte Auffanggefäß mitsamt Filtrat. Öffnen Sie die QIAamp MinElute Spinsäule vorsichtig und tragen Sie 20–150  $\mu$ l Puffer AVE mittig auf die Membran auf. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Zentrifugieren Sie für  $\geq 1$  Minute bei maximaler Drehzahl (ca. 20 000 x g).**



Stellen Sie sicher, dass der Elutionspuffer auf Raumtemperatur äquilibriert ist. Falls die Elution in kleinen Volumina ( $< 50 \mu$ l) erfolgt, muss der Elutionspuffer auf die Mitte der Membran aufgetragen werden, damit die gebundene RNA und/oder DNA vollständig eluiert wird.

Das Elutionsvolumen ist flexibel und kann bedarfsweise an die Anforderungen der nachfolgenden Applikation angepasst werden. Beachten Sie, dass das wiedergefundene Eluatvolumen um ca. 5  $\mu$ l geringer ist als das Elutionspuffervolumen, das auf die Spinsäule pipettiert wird.

## Qualitätskontrolle

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

## Einschränkungen

Die Systemfunktionalität bei der Isolierung viraler Nukleinsäuren wurde unter Verwendung von Plasma- und Serumproben getestet.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Leistungscharakteristik des Systems für jede Methode, die im Labor des Anwenders angewendet wird und die durch die QIAGEN Untersuchungen zur Leistungsevaluierung nicht abgedeckt ist, selbst zu validieren.

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

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

## Leistungscharakteristik

Angaben zur Leistungscharakteristik des QIAamp DSP Virus Spin Kits finden Sie unter [www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance](http://www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance).

## Literatur

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

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

# Symbole



<N>

Kit enthält Reagenzien für die Verarbeitung von <N> Proben



Beachten Sie die Anwendungshinweise



Zur Verwendung bis



In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt



Katalognummer



Wichtiger Hinweis



Chargennummer



Materialnummer



Komponenten



Volumen



Zulässiger Temperaturbereich



Hersteller



Nach Lieferung



Nach Lieferung öffnen; QIAamp MinElute Spinsäulen bei 2–8 °C lagern



\_\_\_\_\_

Nach Ethanol-Zugabe zur Flasche aktuelles Datum aufschreiben



Zugeben



Enthält



<b>LYOPH</b>	Lyophilisiert
<b>RCNS</b>	Rekonstituieren in
<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>GuHCl</b>	Guanidinhydrochlorid
<b>MALEIC ACID</b>	Maleinsäure
<b>SUBT</b>	Subtilisin
<b>GTIN</b>	Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)
<b>→</b>	Führt zu

## Kontaktinformationen

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

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

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

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

# Anhang

## Arbeiten mit RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind sehr widerstandsfähige und aktive Enzyme, die im Allgemeinen keine Cofaktoren benötigen, um aktiv zu sein. Da RNasen nur schwer zu inaktivieren sind und schon geringe Mengen ausreichen, um RNA zu degradieren, dürfen Kunststoff- oder Glas-Laborartikel nur dann verwendet werden, wenn mögliche RNase-Kontaminationen beseitigt wurden. Es sollte darauf geachtet werden, dass während und nach der Präparation keine RNasen in die RNA-Proben gelangen. Um ein RNase-freies Umfeld zu schaffen und aufrechtzuerhalten, sollten die nachfolgenden Vorsichtsmaßnahmen bei der Vorbehandlung und beim Gebrauch von einmal und mehrfach verwendeten Gefäßen und Lösungen eingehalten werden.

## Allgemeine Hinweise zur Handhabung

Das Arbeiten mit RNA sollte immer in angemessener mikrobiologischer und aseptischer Weise erfolgen. Hände und Staubpartikel können Bakterien und Schimmelpilze tragen und stellen so die häufigste Ursache für RNase-Verunreinigungen dar. Tragen Sie daher immer Latex- oder Vinylhandschuhe, wenn Sie mit Reagenzien oder RNA-Proben arbeiten, um eine RNase-Kontamination über die Hautoberfläche oder durch staubige Laborgeräte zu vermeiden. Wechseln Sie die Einmal-Handschuhe häufiger, und verschließen Sie sämtliche Gefäße immer sofort nach Gebrauch.


## Mehrfach-Kunststoffartikel

Mehrfach verwendbare Kunststoffartikel sollten vor der Verwendung wie folgt behandelt werden, um sicherzustellen, dass sie RNase-frei sind. Spülen Sie die Kunststoffartikel gründlich mit 0,1 M NaOH<sup>1</sup>, 1 mM EDTA\* und anschließend mit RNase-freiem Wasser\* (siehe auch den Abschnitt „Lösungen“ auf Seite 27). Chloroformresistentes Kunststoffmaterial kann auch mit Chloroform\* gespült werden, um RNasen zu inaktivieren.

<sup>1</sup> Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (*safety data sheets*, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

## Glasmaterial

Laborartikel aus Glas sollten vor der Verwendung wie folgt behandelt werden, um sicherzustellen, dass sie RNase-frei sind. Reinigen Sie Glasmaterial mit einem Detergens und spülen Sie es anschließend gründlich mit Wasser. Danach werden die RNasen durch Hitzebehandlung in einem Ofen für mindestens vier Stunden (auch über Nacht) bei  $> 240\text{ }^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Autoklavieren allein reicht nicht aus, um alle RNasen zu inaktivieren. Das Backen im Ofen inaktiviert zum einen Ribonukleasen und stellt zum anderen sicher, dass keine anderen Nukleinsäuren (z. B. Plasmid-DNA) auf der Oberfläche des Glasmaterials verbleibt. Alternativ kann das Glasmaterial mit DEPC2 (Diethylpyrocarbonat) behandelt werden. Tauchen Sie dazu die Glasmaterialien in DEPC (0,1 % [v/v] in Wasser) und lassen Sie sie über Nacht (12 Stunden) bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  stehen. Anschließend wird das Glas autoklaviert oder 15 Minuten bei  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt, um restliches DEPC zu entfernen.

 Corex® Röhrchen sollten durch Behandlung mit DEPC – und nicht durch Backen – RNase-frei gemacht werden. Dies reduziert die Ausfallrate dieses Röhrchentyps bei Zentrifugationen.

## Elektrophoresekammern

Elektrophoresekammern sollten mit einem Detergens (z. B. 0,5 % SDS\*) gereinigt, mit Wasser gespült, mit Ethanol<sup>3</sup> getrocknet und anschließend mit einer 3%igen Wasserstoffperoxid-Lösung\* gefüllt werden. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur sollten die Elektrophoresekammern gründlich mit RNase-freiem Wasser ausgespült werden.

## Lösungen

Lösungen (Wasser und andere Lösungen) sollten mit 0,1 % [v/v] DEPC behandelt werden. DEPC reagiert mit primären Aminen und kann daher nicht direkt verwendet werden, um Tris-Puffer zu behandeln. In Anwesenheit von Tris ist DEPC außerordentlich instabil und zerfällt schnell in Ethanol und  $\text{CO}_2$ . Wenn Sie Tris-Puffer ansetzen, so behandeln Sie zuerst das Wasser und lösen dann Tris darin auf.


DEPC ist ein starker, aber kein absoluter Inhibitor von RNasen. Es wird üblicherweise als 0,1%ige Lösung verwendet, um RNasen auf Kunststoff- oder Glasmaterialien zu inaktivieren oder RNase-freie Lösungen und Wasser herzustellen.

2 Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Handschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (*safety data sheets*, SDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

<sup>3</sup> Einige für Elektrophoresekammern verwendete Kunststoffmaterialien sind nicht resistent gegen Ethanol. Beachten Sie bitte die Herstellerangaben.

DEPC inaktiviert RNasen durch kovalente Modifikation. Schon Spuren von DEPC modifizieren die Purinreste der RNA durch Carbethoxylierung. Diese carbethoxylierte RNA lässt sich in zellfreien Systemen nur sehr schlecht translatieren. Trotzdem wird die Fähigkeit, DNA:RNA- oder RNA:RNA-Hybride zu bilden, grundsätzlich nicht beeinträchtigt, solange nicht der überwiegende Teil der Purinreste modifiziert worden ist. DEPC-Reste müssen aus Lösungen oder Gefäßen immer durch Autoklavieren oder durch Erhitzen auf  $100\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  für  $15\text{ Minuten} \pm 1\text{ Minute}$  entfernt werden.

Geben Sie 0,1 ml DEPC in 100 ml zu behandelnde Lösung und schütteln Sie sie heftig, um das DEPC in Lösung zu bringen oder lassen Sie die Lösung für  $> 12\text{ Stunden}$  bei  $37\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$  inkubieren. Autoklavieren Sie danach für  $15\text{ Minuten} \pm 1\text{ Minute}$ , um sämtliche Reste DEPC zu entfernen. In manchen Fällen kann es nützlich sein, das Wasser aus der Reinwasseranlage auf RNase-Kontaminationen zu testen, da viele Anlagen für destilliertes Wasser frei von RNase-Aktivität sind.

 Die Puffer des QIAamp DSP Virus Spin Kits werden nicht durch DEPC-Behandlung RNase-frei gemacht und sind daher frei von DEPC-Kontaminationen.

Warenzeichen/Markennamen: QIAGEN®, QIAamp® QIAcube®, MinElute® (QIAGEN-Gruppe); Corex® (Corning, Inc.).

Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass die in diesem Handbuch verwendeten Markennamen oder Warenzeichen ungeschützt sind, auch wenn sie nicht als Markenname oder Warenzeichen gekennzeichnet sind.

#### **Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für den QIAamp DSP Virus Spin Kit**

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des QIAamp DSP Virus Spin Kits die folgenden Bedingungen an:

1. Der QIAamp DSP Virus Spin Kit darf nur gemäß den Angaben im *QIAamp DSP Virus Spin Kit Handbuch* und mit den Komponenten, die im Kit geliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen ihrer Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zum Kit gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zum Kit gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der im *QIAamp DSP Virus Spin Kit Handbuch* und in zusätzlichen, unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieser Kit und/oder die mit ihm durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzt.
3. Dieser Kit und seine Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich gewährten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Kits stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen könnten oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Kit und/oder dessen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen können unter [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) nachgelesen werden.

© 2015 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

---

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ techservice-au@qiagen.com

**Austria** ■ techservice-at@qiagen.com

**Belgium** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Brazil** ■ suportetecnico.brasil@qiagen.com

**China** ■ techservice-cn@qiagen.com

**Denmark** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Finland** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**France** ■ techservice-fr@qiagen.com

**Germany** ■ techservice-de@qiagen.com

**Hong Kong** ■ techservice-hk@qiagen.com

**India** ■ techservice-india@qiagen.com

**Ireland** ■ techservice-uk@qiagen.com

**Italy** ■ techservice-it@qiagen.com

**Japan** ■ techservice-jp@qiagen.com

**Korea (South)** ■ techservice-kr@qiagen.com

**Luxembourg** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Mexico** ■ techservice-mx@qiagen.com

**The Netherlands** ■ techservice-bnl@qiagen.com

**Norway** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Singapore** ■ techservice-sg@qiagen.com

**Sweden** ■ techservice-nordic@qiagen.com

**Switzerland** ■ techservice-ch@qiagen.com

**UK** ■ techservice-uk@qiagen.com

