

Manuale del kit QIAamp DSP Virus Spin



Versione 1



Per uso diagnostico in vitro



61704



1062686IT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R6



1062686IT



Tecnologie per campioni e analisi QIAGEN

QIAGEN è il fornitore leader nel settore delle tecnologie innovative per campioni e analisi che consentono di isolare e rilevare il contenuto di qualunque campione biologico. I nostri prodotti e i nostri servizi, avanzati e di alta qualità, sono una garanzia di successo, dall'analisi del campione al risultato.

QIAGEN definisce gli standard:

- nella purificazione di DNA, RNA e proteine
- nell'analisi di acidi nucleici e proteine
- nella ricerca su microRNA e RNAi
- nelle tecnologie automatizzate di preparazione dei campioni e analisi

Il nostro obiettivo è il vostro successo. Per ulteriori informazioni, visitate il sito www.qiagen.com.

Indice

Uso previsto	4
Sommario e spiegazione	4
Principi della procedura	4
Purificazione automatizzata degli acidi nucleici virali su QIAcube	4
Materiali in dotazione	9
Contenuto del kit	9
Materiali necessari ma non in dotazione	10
Avvertenze e precauzioni	11
Conservazione e manipolazione dei reagenti	13
Conservazione e manipolazione dei campioni	13
Procedura	14
Punti importanti prima di iniziare	14
Manipolazione delle colonne QIAamp MinElute	14
Centrifugazione	15
Trattamento delle colonne QIAamp MinElute in una microcentrifuga	15
Preparazione di reagenti e tamponi	16
Protocollo: purificazione degli acidi nucleici virali da plasma o siero	19
Controllo di qualità	22
Limitazioni	22
Prestazioni caratteristiche	22
Riferimenti bibliografici	22
Simboli	23
Informazioni sui contatti	24
Appendice	25

Uso previsto

Il kit QIAamp DSP Virus Spin è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione di acidi nucleici virali da campioni biologici.

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare.

Il kit QIAamp DSP Virus Spin è destinato alla diagnostica in vitro.

Sommario e spiegazione

Il kit QIAamp DSP Virus spin si avvale di una tecnologia consolidata per isolare e purificare simultaneamente il DNA e l'RNA virale. Il kit combina le proprietà di legame selettivo della membrana a base di silice nei confronti degli acidi nucleici con volumi di eluizione flessibili tra 20 e 150 µl. La procedura è idonea per campioni di plasma e siero. I campioni possono essere sia freschi che congelati, a condizione che non siano stati congelati e scongelati più di una volta (vedere pag. 12). Gli acidi nucleici virali vengono eluiti nel tampone AVE, pronti per essere utilizzati in reazioni di amplificazione o per la conservazione a una temperatura compresa tra -25°C e -15°C.

Principi della procedura

La procedura QIAamp DSP Virus Spin prevede 4 fasi (lisi, legame, lavaggio, eluizione) e viene eseguita con le colonne QIAamp MinElute® in una microcentrifuga standard o su QIAcube® in modo completamente automatico. La procedura è studiata per minimizzare il potenziale di cross-contaminazione tra campioni e permette di manipolare con sicurezza i campioni potenzialmente infettivi. La semplice procedura QIAamp DSP Virus Spin è idonea per il trattamento simultaneo di più campioni. Il kit QIAamp DSP Virus Spin può essere usato per isolare l'RNA e il DNA virali da un'ampia gamma di RNA e DNA di virus. Tuttavia le caratteristiche di prestazione non sono state accertate per ogni specie virale e devono quindi essere convalidate dall'utente.

Purificazione automatizzata degli acidi nucleici virali su QIAcube

La purificazione degli acidi nucleici virali mediante il kit QIAamp DSP Virus Spin può essere completamente automatizzata su QIAcube. L'innovativo QIAcube utilizza una tecnologia avanzata per processare le colonne spin QIAGEN®, permettendo l'integrazione perfetta di una preparazione automatizzata a bassa resa dei campioni nelle procedure di lavoro del vostro laboratorio. Per la preparazione dei campioni con QIAcube si seguono le stesse fasi della procedura manuale (cioè lisi, legame, lavaggio, eluizione) che permettono di

usare il kit QIAamp DSP Virus Spin per la purificazione di acidi nucleici virali di alta qualità.

In caso di procedura automatizzata del kit QIAamp DSP Virus Spin sullo strumento QIAcube, questo può processare meno di 50 campioni a causa di volumi morti, evaporazione e ulteriore consumo di reagenti durante il pipettaggio automatico. QIAGEN garantisce esclusivamente 50 preparazioni di campioni con l'uso manuale del kit QIAamp DSP Virus Spin.

Per maggiori informazioni sulla procedura automatizzata, consultare la rispettiva scheda del protocollo disponibile nel sito www.qiagen.com/MyQIAcube. Le schede di protocollo aggiornate possono essere scaricate gratuitamente, oppure richieste al reparto di assistenza tecnica QIAGEN (vedere pag. 24).



Figura 1. Il QIAcube.

Lisi con proteasi QIAGEN

I campioni vengono lisati in condizioni altamente denaturanti a temperature elevate. La lisi viene eseguita in presenza di proteasi QIAGEN e di tampone AL, che insieme assicurano l'inattivazione delle RNasi.

Adsorbimento alla membrana QIAamp MinElute

Le condizioni di legame vengono aggiustate con aggiunta di etanolo per consentire un legame ottimale dell'RNA e del DNA virali alla membrana. Successivamente si trasferiscono i lisati a una colonna QIAamp MinElute e gli acidi nucleici virali, al passaggio del lisato, vengono adsorbiti sulla membrana in gel di silice per effetto della centrifugazione. Il sale e le condizioni del pH garantiscono che le proteine e gli altri contaminanti, che possono inibire la PCR e altre reazioni enzimatiche a valle, non siano trattiene dalla membrana QIAamp MinElute.

Le provette di lavaggio da 2 ml (in dotazione) supportano la colonna QIAamp MinElute durante le fasi di caricamento e lavaggio.

Rimozione dei residui contaminanti

Gli acidi nucleici restano legati alla membrana, mentre i contaminanti vengono dilavati efficacemente durante le 3 fasi di lavaggio. Il DNA e l'RNA virali

altamente puri vengono eluiti in una singola fase nel tampone AVE, equilibrato a temperatura ambiente.

Eluizione di acidi nucleici puri

L'eluizione viene eseguita con tampone AVE. Le colonne QIAamp MinElute consentono volumi di eluizione minimi di soli 20 μ l. Il basso volume di eluizione porta ad eluiti altamente concentrati degli acidi nucleici.

Per applicazioni successive che richiedano piccoli volumi iniziali (ad es. alcuni test PCR e RT-PCR), una maggiore concentrazione dell'eluato può aumentare la sensibilità del test.

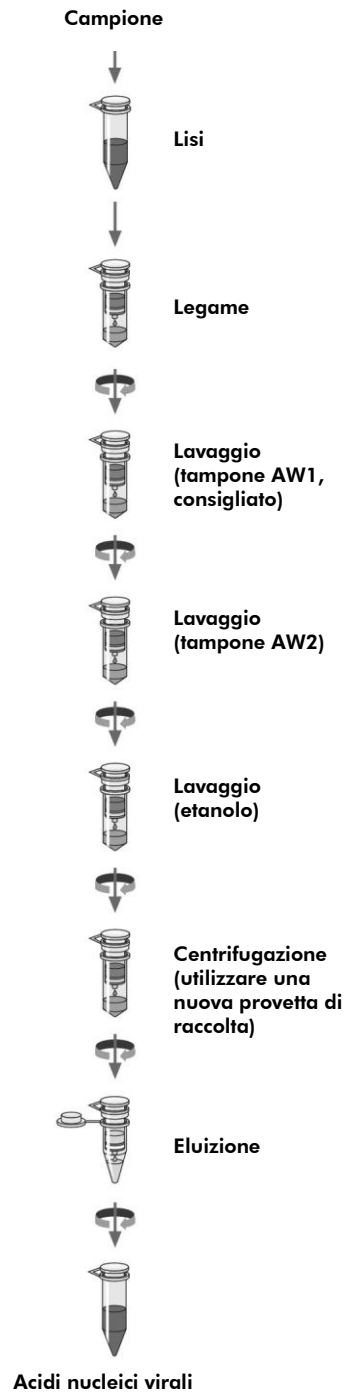
Per applicazioni successive che richiedono un volume iniziale maggiore, il volume di eluizione può essere portato a 150 μ l. Un aumento del volume di eluizione diminuisce tuttavia la concentrazione degli acidi nucleici nell'eluato.

Il volume dell'eluato recuperato può essere inferiore anche di 5 μ l al volume del tampone di eluizione applicato alla colonna; per esempio, un volume del tampone di eluizione di 20 μ l dà >15 μ l di eluito finale. Il volume dell'eluato ottenuto dipende dalla natura del campione.

L'acido nucleico eluito viene raccolto in provette di eluizione da 1,5 ml (ET, in dotazione). Si raccomanda di conservare il DNA o l'RNA a -20°C.

Le rese di acido nucleico virale isolato da campioni biologici sono di norma inferiori a 1 μ g. Per determinare la resa si raccomandano metodi di amplificazione quantitativa. Quando si quantificano gli acidi nucleici isolati con il protocollo QIAamp DSP Virus Spin, bisogna ricordare che nel campione sarà presente una quantità di carrier RNA molto superiore all'RNA virale.

Procedura QIAamp DSP Virus Spin



Completamente automatizzabile su QIAcube

Carrier RNA

Il carrier RNA svolge una duplice funzione. In primo luogo potenzia il legame degli acidi nucleici virali con la membrana QIAamp, soprattutto se il campione contiene un numero molto limitato di molecole target. Secondariamente, aggiungendo grandi quantità di carrier RNA si riduce la possibilità di degradazione dell'RNA virale, nel raro caso che le molecole delle RNasi non vengano denaturate dai sali caotropici e dal detergente nel tampone AL. Se non si aggiunge carrier RNA al tampone AL, si può osservare una diminuzione della quantità di DNA o RNA virale ottenuta.

I diversi sistemi di amplificazione variano in efficienza in funzione della quantità totale degli acidi nucleici presenti nella reazione. Gli eluiti di questo kit contengono sia acidi nucleici virali che carrier RNA, e il quantitativo di carrier RNA supera di gran lunga quello degli acidi nucleici virali. Il calcolo della quantità di eluito da aggiungere alle reazioni di amplificazione a valle dovrebbe essere dunque basato sulla quantità di carrier RNA aggiunta. Per ottenere il massimo livello di sensibilità nelle reazioni di amplificazione, potrebbe rendersi necessario regolare la quantità di soluzione di carrier RNA aggiunta al tampone AL.

Aggiunta di controlli interni

L'uso del protocollo QIAamp DSP Virus Spin in combinazione con i sistemi di amplificazione disponibili sul mercato potrebbe richiedere l'introduzione di un controllo interno nella procedura di purificazione. L'RNA o il DNA di controllo interno dovrebbero essere aggiunti al tampone di lisi insieme al carrier RNA. Per un'efficienza ottimale della purificazione, le molecole per controllo interno devono avere una lunghezza superiore a 200 nucleotidi, perchè l'efficienza di recupero delle molecole più piccole è inferiore.

Consultare le istruzioni del produttore per stabilire la concentrazione ottimale. L'uso di una concentrazione diversa da quella raccomandata potrebbe ridurre l'efficacia dell'amplificazione.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

Kit QIAamp DSP Virus Spin			
N° catalogo			61704
Numero di prep.			50 [§]
QIAamp MinElute	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (Colonne QIAamp MinElute con provette di lavaggio) (2 ml)	COL	50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (2 ml)	LYS TUBE	50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
WT	Wash Tubes (Provette di lavaggio) (2 ml)	WASH TUBE	5 x 50
AL	Lysis Buffer* (Tampone di lisi)	LYS BUF	33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (Tampone di lavaggio 1 [concentrato])	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [†] (concentrate) (Tampone di lavaggio 2 [concentrato])	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE	Elution Buffer [†] (purple caps) (Tampone di eluizione [tappo viola])	ELU BUF	4 x 2 ml
PS	Protease Solvent [†] (Solvente della proteasi)	QPROT SOLV	4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (red caps) (Carrier RNA [tappo rosso])	CAR RNA	310 µg
QP	QIAGEN Protease [‡] (Proteasi QIAGEN)	QPROT	1 fiala
	Manuale	H B	1

* Contiene un sale caotropico. Adottare adeguate misure di sicurezza e indossare i guanti per maneggiarli. Non compatibile con disinfettanti contenenti agenti sbiancanti. Per maggiori informazioni, vedere pag. 11.

[†] Contiene azotidrato di sodio come conservante.

[‡] Vedi "Preparazione di reagenti e tamponi", pag. 16.

[§] In caso di procedura automatizzata del kit QIAamp DSP Virus Spin sullo strumento QIAcube, questo può processare meno di 50 campioni a causa di volumi morti, evaporazione e ulteriore consumo di reagenti durante il pipettaggio automatico. QIAGEN garantisce esclusivamente 50 preparazioni di campioni con l'uso manuale del kit QIAamp DSP Virus Spin.

Materiali necessari ma non in dotazione

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

- Etanolo (96–100%)*
- Pipette[†] e relativi puntali (per evitare la cross-contaminazione, si raccomanda vivamente di utilizzare puntali con filtro)
- Blocco riscaldante[†] per la lisi di campioni a 56°C
- Microcentrifuga[†] (con rotore per provette da 1,5 ml e 2 ml)
- Vortexer
- Per campioni <200 µl: soluzione NaCl 0,9%

* Non usare alcol denaturato, perchè contiene altre sostanze quali metanolo o metiletilchetone.

[†] Per assicurarsi che i campioni vengano processati adeguatamente durante le procedure del kit QIAamp DSP Virus Spin, si raccomanda di calibrare gli strumenti (ad es. pipette e blocchi riscaldanti) secondo le indicazioni dei produttori.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per ulteriori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza sul prodotto (SDS). Le schede SDS, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda MSDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.



ATTENZIONE: NON aggiungere sbiancanti, né soluzioni acide direttamente ai residui contenenti tampone AL o tampone AW1.

Il tampone AL e il tampone AW1 contengono idrocloruro di guanidina, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. In caso di fuoriuscita di liquido contenente questi tamponi, pulire con un apposito detergente da laboratorio e acqua. Se il liquido versato contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, quindi con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

Se i flaconi di tampone sono danneggiati o si riscontrano perdite, indossare guanti e occhiali di protezione per l'operazione di smaltimento, per evitare lesioni personali a sé o ad altri.

QIAGEN non ha testato i residui liquidi generati dalla procedura QIAamp DSP Virus Spin per la presenza di materiali residui infetti. La contaminazione dei residui liquidi da parte di materiali infetti residui è altamente improbabile, ma non può essere esclusa completamente. Pertanto i residui liquidi devono essere considerati infetti e vanno smaltiti in conformità alle vigenti normative di sicurezza locali.

Ai componenti del kit QIAamp DSP Virus Spin sono associate frasi di rischio e di sicurezza:

Le seguenti frasi precauzionali e di rischio sono valide per i componenti del QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Tampone AL



Contiene: guanidina cloridrato; acido maleico. Avvertenza! Può essere nocivo in caso di ingestione o se inalato. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può provocare una reazione allergica cutanea. Se l'irritazione oculare persiste: consultare un medico. Togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

Tampone AW1



Contiene: guanidina cloridrato. Avvertenza! Nocivo in caso di ingestione o se inalato. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico in caso di malessere. Smaltire il prodotto/il recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti approvato. Togliere immediatamente tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

QIAGEN Proteasi



Contiene: subtilisina. Pericolo! Provoca una lieve irritazione cutanea. Provoca gravi lesioni oculari. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Non respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol. Smaltire il prodotto/il recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti approvato. In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO DI INALAZIONE: se la respirazione è difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/un medico. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. Indossare un apparecchio di protezione respiratoria.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Conservare le colonne QIAamp MinElute a 2–8°C dopo la consegna del kit.

Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C).

Il carrier RNA liofilizzato può essere conservato a temperatura ambiente (15–25°C) fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit. Il carrier RNA può essere disciolto soltanto nel tampone AVE; il carrier RNA disciolto deve essere aggiunto immediatamente al tampone AL, come descritto a pag. 16. Questa soluzione deve essere preparata al momento e rimane stabile max. 48 ore se conservata a 2–8°C. Le porzioni inutilizzate di RNA disciolto nel tampone AVE devono essere congelate in aliquote tra –30 e –15 °C.

La proteasi QIAGEN liofilizzata (QP) può essere conservata a temperatura ambiente (15–25°C) fino alla data di scadenza senza alcuna perdita di prestazioni.

La proteasi QIAGEN (QP) ricostituita in solvente per proteasi (PS) è stabile fino ad un anno se conservata a 2–8°C, ma solo fino alla data di scadenza del kit. Evitare di tenere a temperatura ambiente per lunghi periodi la soluzione madre di proteasi QIAGEN.

Il tampone 1 (AW1) di lavaggio ricostituito e il tampone 2 (AW2) di lavaggio ricostituito sono stabili fino ad un anno se conservati a temperatura ambiente (15–25°C), ma solo fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Dopo il prelievo e la centrifugazione, è possibile conservare plasma e siero a 2–8°C per un massimo di 6 ore. Per una conservazione a lungo termine, è consigliato il congelamento a –20°C o –80°C in aliquote. I campioni di siero e plasma non devono essere scongelati più di una volta. Il congelamento–decongelamento ripetuto causa la denaturazione e la precipitazione delle proteine, con la conseguente riduzione dei titoli virali e quindi delle rese di acidi nucleici virali. Inoltre, i crioprecipitati che si formano durante il congelamento e lo scongelamento ripetuti ostruiscono la membrana QIAamp MinElute. Se sono visibili crioprecipitati, farli sedimentare per centrifugazione a circa 6800 x g per 3 minuti. Aspirare e processare immediatamente il supernatante emerso, senza toccare il sedimento.

Procedura

Punti importanti prima di iniziare

- Dopo aver ricevuto il kit, controllare se i componenti del kit sono danneggiati. Se le confezioni blister o i flaconi di tampone appaiono danneggiati, rivolgersi al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale. In caso di versamento di liquidi, consultare la sezione “Avvertenze e precauzioni” (pag. 11). Non utilizzare componenti del kit danneggiati, poiché il loro utilizzo potrebbe ridurre le prestazioni del kit.
- Utilizzare sempre attrezzature prive di RNasi.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Per ridurre al minimo la cross-contaminazione, si consiglia di utilizzare puntali con filtro.
- Tutte le fasi di centrifugazione sono eseguite a temperatura ambiente (15–25°C).
- Utilizzare sempre guanti monouso e controllare regolarmente che questi non siano contaminati da materiale campione. Se i guanti risultano contaminati, gettarli.
- Per ridurre al minimo la cross-contaminazione, aprire solo una provetta per volta.
- Non utilizzare contemporaneamente componenti appartenenti a kit differenti per la stessa procedura, a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Per escludere i rischi derivante dall'uso del materiale potenzialmente infetto, si raccomanda di operare in condizioni di flusso d'aria laminare, finché non ha avuto luogo la lisi dei campioni.
- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto nelle pratiche di laboratorio per la diagnostica in vitro.

Manipolazione delle colonne QIAamp MinElute

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, per la manipolazione delle colonne QIAamp MinElute occorre osservare le seguenti precauzioni per evitare la cross-contaminazione tra le preparazioni dei campioni:

- Applicare con cura il campione o la soluzione alla colonna QIAamp MinElute. Pipettare il campione nella colonna QIAamp MinElute senza bagnare il bordo della colonna.

- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Si consiglia vivamente l'uso di puntali con filtro.
- Evitare di toccare la membrana QIAamp MinElute con il puntale della pipetta.
- Dopo tutte le fasi di centrifugazione a impulsi con vortex, centrifugare brevemente le provette per microcentrifuga per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
- Indossare i guanti durante tutta la procedura. In caso di contatto tra i guanti e il campione, cambiare i guanti immediatamente.

Centrifugazione

- Le provette per lavaggio e per eluizione per tutte le fasi di centrifugazione sono in dotazione al kit.
- La centrifugazione delle colonne QIAamp MinElute viene eseguita a circa 6000 x g per ridurre la rumorosità. La centrifugazione delle colonne QIAamp MinElute alla massima velocità non influisce sulla resa di DNA o RNA.
- La centrifugazione alla fine della procedura di lavaggio e per l'eluizione dovrebbe invece essere eseguita alla massima velocità.
- Tutte le fasi di centrifugazione devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C).

Trattamento delle colonne QIAamp MinElute in una microcentrifuga

- Chiudere la colonna QIAamp MinElute prima di collocarla nella microcentrifuga. Centrifugare come descritto.
- Rimuovere la colonna QIAamp MinElute e la provetta di lavaggio dalla microcentrifuga.
- Inserire la colonna QIAamp MinElute in una nuova provetta di lavaggio. Gettare il filtrato e la provetta di lavaggio. Attenzione: il filtrato può contenere residui pericolosi e deve essere smaltito secondo corrette procedure.
- Aprire una sola colonna QIAamp MinElute per volta, facendo attenzione a non generare aerosol.

Per un efficiente trattamento parallelo di più campioni, si consiglia di riempire un rack con provette di lavaggio in modo da potervi trasferire le colonne QIAamp MinElute dopo la centrifugazione. Le provette di lavaggio usate contenenti il filtrato possono essere gettate e le nuove, contenenti le colonne QIAamp MinElute, collocate direttamente nella microcentrifuga.

Preparazione di reagenti e tamponi

■ Preparazione dell'RNA

Quando si prepara l'RNA virale, operare rapidamente durante le fasi manuali della procedura e leggere l'Appendice a pag. 25 prima di iniziare.

■ Preparazione della proteasi QIAGEN

Aggiungere l'intero contenuto della fiala di solvente della proteasi (PS), ovvero 4,4 ml, alla provetta contenente la proteasi QIAGEN (QP) liofilizzata e miscelare con cura. Per evitare la formazione di schiuma, miscelare capovolgendo più volte la fiala. Assicurarsi che la proteasi QIAGEN (QP) sia completamente disciolta.

i Non aggiungere la proteasi QIAGEN (QP) direttamente al tampone AL.*

La proteasi QIAGEN (QP) ricostituita in solvente per proteasi (PS) è stabile fino ad un anno se conservata a 2–8°C, ma solo fino alla data di scadenza del kit. Evitare di tenere a temperatura ambiente per lunghi periodi la soluzione madre di proteasi QIAGEN.

■ Aggiunta del carrier RNA al tampone AL*

Aggiungere 310 µl di tampone AVE alla provetta contenente 310 µg di carrier RNA liofilizzato, ottenendo quindi una soluzione di 1 µg/µl. Disciogliere completamente il carrier RNA, suddividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservarlo a una temperatura da –25°C a –15°C. Non congelare e scongelare le aliquote di carrier RNA più di 3 volte.

i Il carrier RNA non si dissolve nel tampone AL. È prima necessario discioglierlo nel tampone AVE e successivamente aggiungerlo al tampone AL.

Calcolare il volume della miscela di tampone di lisi AL/carrier RNA per ogni gruppo di campioni, selezionando nella Tabella 1 (pagina 17) il numero di campioni da processare contemporaneamente. Per un numero maggiore di campioni, si possono calcolare i volumi come descritto qui di seguito:

* Contiene sale caotropico. Adottare adeguate misure di sicurezza da laboratorio e indossare guanti per la manipolazione. Non compatibile con disinfettanti contenenti agenti sbiancanti. Vedere pagina 11 per le informazioni di sicurezza.

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

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

dove: **n** = numero di campioni da elaborare simultaneamente
y = volume calcolato del tampone AL
z = volume di carrier RNA–tampone AVE da aggiungere al tampone AL

Miscelare delicatamente la provetta capovolgendola 10 volte. Per evitare la formazione di schiuma, non utilizzare il vortex.

Tabella 1. Volumi di tampone AL e miscela di carrier RNA–tampone AVE necessari per una determinata quantità di campioni per la procedura QIAamp DSP Virus Spin

N. campioni	Vol. tampone AL (ml)	Vol. carrier RNA–AVE (μl)	N. campioni	Vol. tampone AL (ml)	Vol. carrier RNA–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



La procedura di preparazione dei campioni è ottimizzata per 5,6 μg di carrier RNA per campione. Se una minore quantità di carrier RNA dimostra di essere più indicata per un determinato sistema di amplificazione, trasferire solo la quantità necessaria di carrier RNA disciolta nelle provette contenenti tampone AL. Per ogni microgrammo di carrier RNA necessario per ogni preparazione, aggiungere 5 μl di carrier RNA disciolto in tampone AVE

per ogni millilitro di tampone AL. L'uso di meno di 5,6 µg di carrier RNA per campione deve essere convalidato per ogni particolare tipo di campione e di test a valle.

Tampone AW1*

Aggiungere 25 ml di etanolo (96–100%) a un flacone contenente 19 ml di tampone AW1 come descritto sul flacone. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Conservare il tampone AW1 ricostituito a temperatura ambiente (15–25°C). Il tampone AW1 ricostituito è stabile fino ad un anno se conservato a temperatura ambiente, ma solo fino alla data di scadenza del kit.

 Miscelare sempre il tampone AW1 ricostituito agitandolo prima di iniziare la procedura.

Tampone AW2†

Aggiungere 30 ml di etanolo (96–100%) a un flacone contenente 13 ml di tampone AW2 come descritto sul flacone. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Conservare il tampone AW2 ricostituito a temperatura ambiente (15–25°C). Il tampone AW2 ricostituito è stabile fino ad un anno se conservato a temperatura ambiente, ma solo fino alla data di scadenza del kit.

 Miscelare sempre il tampone AW2 ricostituito agitandolo prima di iniziare la procedura.

Eluizione degli acidi nucleici

Il tampone di eluizione deve essere termostatato a temperatura ambiente prima di applicarlo alla colonna.

* Contiene sale caotropico. Adottare adeguate misure di sicurezza da laboratorio e indossare guanti per la manipolazione. Non compatibile con disinfettanti contenenti agenti sbiancanti. Vedere pagina 11 per le informazioni di sicurezza.

† Contiene azotidrato di sodio come conservante.

Protocollo: purificazione degli acidi nucleici virali da plasma o siero

Questo protocollo è destinato alla purificazione degli acidi nucleici virali da 200 μ l di plasma o siero mediante il kit QIAamp DSP Virus Spin e una microcentrifuga. Per la purificazione automatica utilizzando il kit QIAamp DSP Virus Spin con il QIAcube, vedere il manuale utente QIAcube (*QIAcube User Manual*) e il protocollo relativo.

Punto importante prima di iniziare


- Tutte le fasi di centrifugazione sono eseguite a temperatura ambiente (15–25°C).

Prima di iniziare

- Termostatare i campioni a temperatura ambiente (15–25°C).
- Termostatare il tampone AVE a temperatura ambiente per l'eluizione nella fase 14.
- Impostare un blocco riscaldante a 56°C \pm 3°C per utilizzarlo nella fase 4.
- Assicurarsi che il tampone AW1, il tampone AW2 e la proteasi QIAGEN (QP) siano stati preparati secondo le istruzioni delle pagine 16–18.
- Aggiungere al tampone AL il carrier RNA ricostituito nel tampone AVE, seguendo le istruzioni a pag. 16.

Procedura

1. Pipettare 25 μ l di proteasi QIAGEN (QP) in una provetta di lisi (LT).

 Per informazioni sulla risospensione della proteasi QIAGEN (QP) in solvente per proteasi (PS), consultare "Preparazione di reagenti e tamponi" a pag. 16.

2. Aggiungere 200 μ l di plasma o siero alla provetta di lisi (LT).

Se il volume del campione è inferiore a 200 μ l aggiungere il volume appropriato di soluzione di cloruro di sodio 0,9% per ottenere un volume totale di proteasi e campione di 225 μ l.

3. Aggiungere 200 μ l di tampone AL (contenente 28 μ g/ml di carrier RNA). Chiudere il tappo e miscelare in vortice per \geq 15 secondi.

Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone AL in modo da ottenere una soluzione omogenea.



Non aggiungere la proteasi QIAGEN (QP) direttamente al tampone AL.

4. **Incubare a $56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti ± 1 minuto in blocco riscaldante.**
5. **Centrifugare brevemente la provetta di lisi (LT) per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.**
6. **Aggiungere 250 μl di etanolo (96–100%) al campione, chiudere il coperchio e miscelare con vortex per ≥ 15 secondi. Incubare il lisato con l'etanolo per 5 minuti ± 30 secondi a temperatura ambiente ($15\text{--}25^{\circ}\text{C}$).**



Se la temperatura ambiente supera i 25°C , raffreddare l'etanolo su ghiaccio prima di aggiungerlo al lisato.

7. **Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.**
8. **Applicare attentamente tutto il lisato ottenuto nella fase 7 alla colonna QIAamp MinElute senza bagnarne il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per > 1 minuto. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta pulita di lavaggio (WT) da 2 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il filtrato.**

Se il lisato non è ancora passato tutto attraverso la colonna dopo la centrifugazione, centrifugare di nuovo a velocità più elevata fino a che la colonna QIAamp MinElute non sia vuota.

9. **Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 μl di tampone AW1 senza bagnarne il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per ≥ 1 minuto. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta pulita di lavaggio (WT) da 2 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il filtrato.**
10. **Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 μl di tampone AW2 senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per > 1 minuto. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta pulita di lavaggio da 2 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il filtrato.**
11. **Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 μl di etanolo (96–100%) senza bagnare il bordo. Chiudere il tappo e centrifugare a circa 6000 x g per > 1 minuto. Gettare la provetta di lavaggio contenente il filtrato.**

Il carryover di etanolo nell'eluato può causare problemi nelle applicazioni a valle. Alcuni rotori di centrifuga possono vibrare in fase di decelerazione, facendo sì che il flow-through, contenente etanolo, venga a contatto con la colonna QIAamp MinElute. Anche quando si rimuovono la colonna

QIAamp MinElute e la provetta di lavaggio del rotore può succedere che il flow-through venga a contatto con la colonna QIAamp MinElute.

- 12. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio (WT) pulita da 2 ml. Centrifugare alla massima velocità (circa 20 000 x g) per 3 minuti \pm 30 secondi per asciugare completamente la membrana.**
- 13. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una nuova provetta di lavaggio (WT) da 2 ml, aprire il coperchio e incubare il tutto a 56°C \pm 3°C per 3 minuti \pm 30 secondi per asciugare completamente la membrana.**

Questa fase serve a far evaporare eventuali residui di liquido.

- 14. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta per eluizione (ET) e gettare la provetta di lavaggio con il filtrato. Aprire con cautela il coperchio della colonna QIAamp MinElute e aggiungere 20–150 μ l di tampone AVE nel centro della membrana. Chiudere il coperchio e incubare a temperatura ambiente per 5 minuti. Centrifugare alla massima velocità (circa 20 000 x g) per >1 minuto.**



Accertarsi che il tampone di eluizione sia termostato a temperatura ambiente. Se si esegue l'eluizione su piccoli volumi (<50 μ l), il tampone di eluizione deve essere dispensato sul centro della membrana per l'eluizione completa dell'RNA e del DNA legati.

Il volume di eluizione è flessibile e può essere adattato alle esigenze dell'applicazione a valle. Rammentare che il volume di eluito recuperato sarà inferiore di circa 5 μ l al volume del tampone di eluizione applicato alla colonna.

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità certificato ISO di QIAGEN, ogni lotto del kit QIAamp DSP Virus Spin è stato testato in base a specifiche predefinite per garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Le prestazioni del sistema sono state accertate mediante campioni di plasma e siero per l'isolamento degli acidi nucleici virali.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

Per ridurre al minimo il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad appropriati controlli delle applicazioni a valle. Per un'ulteriore convalida consigliamo di attenersi alle linee guida della Conferenza Internazionale sull'Armonizzazione dei Requisiti Tecnici (ICH) riportate in ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology" (Convalida dei Metodi Analitici: Testo e Metodologia).

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Prestazioni caratteristiche

Per le prestazioni caratteristiche del kit QIAamp DSP Virus Spin consultare www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance.

Riferimenti bibliografici

QIAGEN possiede un'ampia banca dati online continuamente aggiornata con le pubblicazioni scientifiche riguardanti i prodotti QIAGEN. Specifiche opzioni di ricerca consentono di trovare gli articoli necessari sia per parole chiave, sia specificando l'applicazione, l'area di ricerca, il titolo, ecc.

Per un elenco bibliografico completo, visitare il sito QIAGEN Reference Database www.qiagen.com/RefDB/search.asp oppure contattare il centro di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale.

Simboli



<N>

Il kit contiene reagenti sufficienti per <N> preparazione di campioni



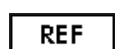
Fare riferimento alle informazioni fornite nel manuale



Data di scadenza



Dispositivo medico per diagnostica in vitro



Numero di catalogo



Nota importante



Numero di lotto



Numero di materiale



Componenti



Volume



Limite di temperatura



Produttore



Al momento della consegna



Aprire alla consegna; conservare le colonne QIAamp MinElute a 2–8°C



Trascrivere la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone



Aggiunta



Contiene

LYOPH	Liofilizzato
RCNS	Ricostituire in
EtOH	Etanolo
GuHCl	Iidrocloruro di guanidina
MALEIC ACID	Acido maleico
SUBT	Subtilisina
GTIN	Global Trade Item Number
→	Porta a

Informazioni sui contatti

QIAGEN è orgogliosa della qualità e della disponibilità del proprio supporto tecnico. Il nostro reparto di assistenza tecnica è composto da scienziati esperti che hanno alle spalle una lunga esperienza maturata a livello pratico e teorico nelle tecnologie per campioni e analisi e nell'impiego dei prodotti QIAGEN. In caso di domande o difficoltà riguardanti il kit QIAamp DSP Virus Spin o i prodotti QIAGEN in generale, non esitate a contattarci.

I clienti QIAGEN sono la fonte principale d'informazione relativa all'uso avanzato o specializzato dei nostri prodotti. Tali informazioni sono utili sia agli altri ricercatori che a quelli della QIAGEN. Pertanto vi esortiamo a contattarci, in caso di suggerimenti da darci sulle prestazioni dei prodotti o su nuove applicazioni e tecniche.

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultate il nostro sito www.qiagen.com/Support oppure contattate il servizio assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultate il retro della copertina o il sito www.qiagen.com).

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

Appendice

Manipolazione dell'RNA

Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Dato che le RNasi sono difficilmente inattivabili e dato che sono sufficienti in piccolissime quantità per distruggere l'RNA, si raccomanda di non utilizzare plastica e vetreria da laboratorio senza aver prima eliminato una possibile contaminazione da RNasi. Prestare particolare attenzione allo scopo di evitare di introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente privo di RNasi, mentre si lavora con l'RNA adottare le seguenti precauzioni durante il pretrattamento e l'uso di recipienti monouso e riutilizzabili e di soluzioni.

Manipolazione in genere

Adottare sempre una corretta tecnica di asepsi microbiologica quando si opera con l'RNA. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono la fonte più comune di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile mentre si manipolano reagenti e campioni di RNA per evitare la contaminazione da RNasi causata dalla superficie cutanea o da apparecchiature di laboratorio polverose. Cambiare spesso i guanti e tenere chiuse le provette.

Plastica da laboratorio riutilizzabile

La plastica da laboratorio riutilizzabile deve essere trattata prima dell'uso per assicurarsi che sia esente da RNasi. Lavare a fondo la plastica da laboratorio riutilizzabile con 0,1 M NaOH,* 1 mM EDTA* seguiti da acqua esente da RNasi* (vedere "Soluzioni", pag. 26). In alternativa, la plastica resistente al cloroformio può essere lavata con cloroformio* per disattivare le RNasi.

Vetreria

La vetreria deve essere trattata prima dell'uso per assicurarsi che sia esente da RNasi. La vetreria usata per lavorare con l'RNA prima dell'uso deve essere lavata con detergente, risciacquata a fondo e tenuta in forno a $>240^{\circ}\text{C}$ per quattro ore o più (per tutta la notte, se è più comodo). Il solo autoclavaggio non è sufficiente a inattivare del tutto molte RNasi. La sosta in forno disattiva le ribonucleasi e al tempo stesso assicura che sulla superficie della vetreria non

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

rimangano altri acidi nucleici (ad es. DNA plasmidico). In alternativa è possibile trattare la vetreria con DEPC* (dietilpirocarbonato). Coprire la vetreria con DEPC 0,1% in acqua per 12 ore a 37°C, poi autoclavare o riscaldare a 100°C per 15 minuti per eliminare ogni residuo di DEPC.

i Le provette Corex® devono essere rese esenti da RNasi con DEPC e non con sosta in forno. In questo modo si riduce la percentuale di errori di questo tipo di provette durante la centrifugazione.

Vasche per elettroforesi

Le vasche per elettroforesi devono essere lavate con soluzione detergente (per es. SDS 0,5%),* risciacquate con acqua, asciugate con etanolo,*† e poi riempite con una soluzione di perossido d'idrogeno al 3%.* Dopo 10 minuti a temperatura ambiente, risciacquare accuratamente le vasche con acqua esente da RNasi.

Soluzioni

Le soluzioni (acqua e altre soluzioni) devono essere trattate con DEPC 0,1%. Il DEPC reagisce con le amine primarie e non può essere usato direttamente per trattare i tamponi Tris. Il DEPC è estremamente instabile in presenza di tamponi Tris e si decompone rapidamente in etanolo e CO₂. Quando si preparano i tamponi Tris, prima trattare l'acqua con DEPC e poi dissolvere il Tris per ottenere il tampone del caso.

Il DEPC è un inibitore delle RNasi potente, ma non assoluto. Viene comunemente usato in una concentrazione dello 0,1% per inattivare le RNasi su vetreria o plastica da laboratorio o per creare soluzioni e acqua prive di RNasi. Il DEPC inattiva le RNasi mediante modifica covalente. I residui di purine nell'RNA sono modificati per carbossilazione dal DEPC anche in quantità traccia. L'RNA carbossilato si traduce con bassissima efficienza nei sistemi acellulari. Tuttavia la sua capacità di formare ibridi DNA:RNA o RNA:RNA non viene compromessa seriamente a meno che non sia stata modificata una frazione cospicua dei residui di purina. Il DEPC residuo deve essere sempre eliminato dalle soluzioni o dai recipienti mediante autoclavaggio o riscaldamento a 100°C ± 3°C per 15 minuti ± 1 minuto.

* Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

† Alcune plastiche usate per le vasche per elettroforesi non sono resistenti all'etanolo. Adottare le precauzioni del caso e seguire le istruzioni del fornitore.

Aggiungere 0,1 ml di DEPC a 100 ml della soluzione da trattare e agitare vigorosamente per dissolvere il DEPC oppure incubare la soluzione per >12 ore a $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Autoclavare per 15 minuti ± 1 minuto per eliminare ogni traccia di DEPC. È preferibile testare le fonti d'acqua per la presenza di RNasi contaminanti poichè molte fonti di acqua distillata sono esenti da attività di RNasi.

① I tamponi del kit QIAamp DSP Virus Spin non sono resi esenti da RNase mediante trattamento con DEPC e pertanto sono esenti da ogni contaminazione da DEPC.

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute® (Gruppo QIAGEN); Corex® (Corning, Inc.).

I marchi, nomi registrati, ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

Contratto di Licenza Limitato per il kit QIAamp DSP Virus Spin

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del kit QIAamp DSP Virus Spin delle seguenti condizioni:

- 1 Il kit QIAamp DSP Virus Spin deve essere usato unicamente secondo le istruzioni contenute nel *Manuale del kit QIAamp DSP Virus Spin* e in combinazione con i componenti contenuti nel kit stesso. QIAGEN non concede alcuna licenza, in relazione a qualunque proprietà intellettuale, per l'uso o l'aggiunta dei componenti del kit ad altri componenti non contenuti nel kit, ad eccezione di quanto descritto nel *Manuale del kit QIAamp DSP Virus Spin* e nei protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com.
- 2 Se non espressamente dichiarato nelle licenze, QIAGEN non garantisce in alcun modo che questi kit e/o il relativo impiego non violino i diritti di terze parti.
- 3 Il presente kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per l'impiego monouso e non possono essere riutilizzati, ripristinati o rivenduti.
- 4 QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
- 5 L'acquirente e l'utente del kit concordano di non eseguire azioni, nè permettere al altri di eseguire azioni, che possano condurre agli atti vietati sopra o ad agevolarli. QIAGEN può imporre presso qualunque tribunale i divieti del presente Contratto di licenza limitato, e recupererà tutte le spese di investigazione e legali, comprese le parcelle degli avvocati, in qualunque azione per imporre il presente Contratto di licenza limitato o qualunque diritto di proprietà intellettuale correlato al kit e/o ai suoi componenti.

Per le condizioni di licenza aggiornate, consultare il sito www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

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

