

Handbok till QIAamp DSP Virus Spin-kit



Version 1



För in vitro-diagnostisk användning



61704



1062686SV



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

TYSKLAND

R6



1062686SV



QIAGEN provtagnings- och analysmetoder

QIAGEN är den ledande tillverkaren av innovativa provtagnings- och analysmetoder, som möjliggör isolering och detektion av innehållet i vilket som helst biologiskt prov. Våra avancerade, högkvalitativa produkter och tjänster säkerställer framgång från prov till resultat.

QIAGEN bestämmer normerna vid:

- Rening av DNA, RNA och proteiner
- Nukleinsyre- och proteinanalyser
- mikroRNA-forskning och RNAi
- Automatisering av provtagnings- och analysmetoder

Vår mission är att göra det möjligt för dig att uppnå stor framgång och genombrott. För ytterligare information, se www.qiagen.com.

Innehåll

Avsedd användning	4
Sammanfattning och förklaring	4
Principer för förfarandet	4
Automatisk rening av virala nukleinsyror i QIAcube	4
Material som medföljer	9
Kitets innehåll	9
Material som behövs men inte medföljer	10
Varningar och försiktighet	11
Förvaring och hantering av reagens	13
Förvaring och hantering av prover	13
Förfarande	14
Viktigt att tänka på före start	14
Hantering av QIAamp MinElute-kolonner	14
Centrifugering	15
Bearbetning av QIAamp MinElute-kolonner i en mikrocentrifug	15
Beredning av reagens och buffertar	15
Protokoll: Rening av virala nukleinsyror från plasma eller serum	19
Kvalitetskontroll	22
Begränsningar	22
Prestandaegenskaper	22
Referenser	22
Symboler	23
Kontaktinformation	24
Bilaga	25

Avsedd användning

QIAamp DSP Virus Spin-kitet är ett system som använder kvartsmembranteknik (QIAamp-teknik) för isolering och rening av virala nukleinsyror från biologiska prover.

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, såsom tekniker och läkare som är utbildade i molekylärbiologiska metoder.

QIAamp DSP Virus Spin-kitet är avsett för in vitro-diagnostiskt bruk.

Sammanfattning och förklaring

QIAamp DSP Virus Spin-kitet använder en väletablerad teknik för samtidig rening av viralt DNA och RNA. Kitet innehåller en kombination av det kvartsbaserade membranets selektivt bindande egenskaper med flexibla elueringsvolymmer mellan 20 och 150 µl. Processen är lämplig för användning med plasma och serum. Proverna kan vara antingen färska eller frysta, under förutsättning att de inte har frysts in och tinats upp mer än en gång (se sidan 13). Virala nukleinsyror elueras i AVE-buffert, bruksfärdigt för förstärkningsreaktioner eller förvaring vid –25 °C till –15 °C.

Principer för förfarandet

QIAamp DSP Virus Spin-förfarandet består av 4 steg (lysering, bindning, tvätt, eluering) och utförs med användning av QIAamp MinElute®-kolonner i en mikrocentrifug av standardtyp eller helautomatiskt i QIAcube®. Processen är utformad för att minimera risken för korskontamination mellan prover och medger säker hantering av potentiellt smittbärande prover. Den enkla QIAamp DSP Virus Spin-processen är lämplig för bearbetning av flera prover samtidigt. QIAamp DSP Virus Spin-kitet kan användas för isolering av viralt RNA och DNA från ett brett urval av RNA- och DNA-virus. Prestandaegenskaperna för varje virussort har emellertid inte fastställts, och måste valideras av användaren.

Automatisk rening av virala nukleinsyror i QIAcube

Rening av virala nukleinsyror med användning av QIAamp DSP Virus Spin-kitet kan helautomatiseras i QIAcube. I den innovativa QIAcube används avancerad teknik för att bearbeta QIAGEN® spin-kolonner, vilket möjliggör en sömlös integration av automatiserad provberedning med lågt genomflöde i ditt laboratoriums arbetsflöde. Provberedningen i QIAcube sker med samma steg som vid den manuella processen (dvs. lysering, bindning, tvätt och eluering), så att du kan använda QIAamp DSP Virus Spin-kitet för rening av högkvalitativa virala nukleinsyror.

Om QIAamp DSP Virus Spin-kitet automatiseras på QIAcube-instrumentet, kan instrumentet eventuellt bearbeta färre än 50 prover på grund av dödvolym, avdunstning och ytterligare reagensförbrukning genom automatiserad

pipettering. QIAGEN garanterar endast 50 provberedningar vid manuell användning av QIAamp DSP Virus Spin-kitet.

För mer information om den automatiserade processen, se relevant protokollblad som finns på www.qiagen.com/MyQIAcube. Uppdaterade protokollblad kan laddas ned kostnadsfritt eller beställas genom att kontakta QIAGENs avdelning för teknisk service (se sidan 24).



Figur 1. QIAcube.

Lysering med QIAGEN proteas

Proverna lyseras under högdenaturerande förhållanden vid förhöjda temperaturer. Lysering utförs i närvaro av QIAGEN proteas och AL-buffert, som tillsammans säkerställer inaktivering av RNaser.

Adsorption av QIAamp MinElute-membranet

Bindningsförhållandena justeras genom att tillsätta etanol för att medge optimal bindning av viralt RNA och DNA till membranet. Lysatet överförs därefter till en QIAamp MinElute-kolonn, och virala nukleinsyror adsorberas till kvartsgelmembranet när lysatet dras igenom detta med hjälp av centrifugering. Salt- och pH-förhållandena säkerställer att protein och andra kontaminanter som kan försämra PCR och andra nedströms enzymatiska reaktioner inte fastnar på QIAamp MinElute-membranet.

Tvättrören på 2 ml (medföljer) stödjer QIAamp MinElute-kolonnen under laddnings- och tvättstegen.

Avlägsnande av kvarvarande kontaminanter

Nukleinsyrorna förblir bundna till membranet medan kontaminanterna effektivt tvättas bort under 3 tvättsteg. I ett och samma steg elueras högrenat viralt RNA och DNA i AVE-buffert, som ekvilibrerats till rumstemperatur.

Eluering av rena nukleinsyror

Eluering sker med användning av AVE-buffert. QIAamp MinElute-kolonnen möjliggör minimala elueringsvolymmer på endast 20 μ l. Låga elueringsvolymmer leder till högkoncentrerade nukleinsyreeluat.

För nedströms applikationer som kräver små startvolymmer (t.ex. vissa PCR- och RT-PCR-analyser) kan ett mer koncentrerat eluat öka analysens känslighet.

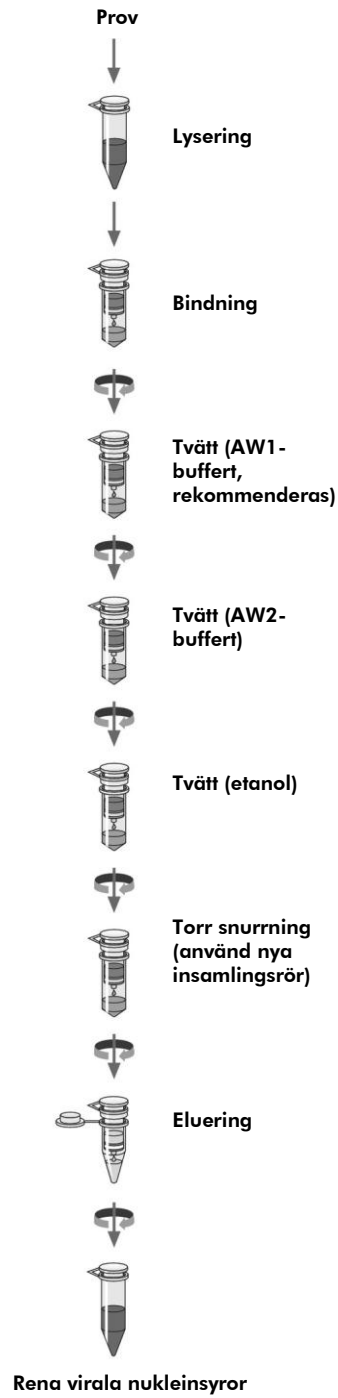
För nedströms applikationer som kräver en större startvolym kan elueringsvolymen ökas upp till 150 μ l. En ökning av elueringsvolymen kommer emellertid att minska koncentrationen på nukleinsyrorna i eluatet.

Den erhållna eluatvolymen kan vara upp till 5 μ l mindre än den volym elueringsbuffert som tillsattes till kolonnen. En elueringsbuffertvolym på 20 μ l leder till exempel till > 15 μ l slutligt eluat. Volymen erhållet eluat beror på provets egenskaper.

Eluerad nukleinsyra samlas upp i 1,5 ml elueringsrör (ET, medföljer). Förvaring av DNA eller RNA vid -20 °C rekommenderas.

Utbytet av virala nukleinsyror som isolerats från biologiska prover är normalt under 1 μ g. Kvantitativa förstärkningsmetoder rekommenderas för att fastställa utbytet. Vid kvantifiering av nukleinsyror som isolerats med användning av QIAamp DSP Virus Spin-protokollet måste man komma ihåg att det kommer att finnas avsevärt mer bärar-RNA i provet än viralt RNA.

QIAamp DSP Virus Spin-



Möjligt att helautomatisera i QIAcube

Bärrar-RNA

Bärrar-RNA har två funktioner. För det första förbättrar det bindningen av virala nukleinsyror till QIAamp-membranet, särskilt om det är mycket få målmolekyler i provet. För det andra minskar tillsatsen av stora mängder bärrar-RNA risken för viral RNA-nedbrytning i den sällsynta händelsen att RNase-molekylerna undgår denatureringen genom de kaotropiska salterna och rengöringsmedlen i AL-buffert. Om bärrar-RNA inte tillsätts AL-buffert kan detta leda till minskad återhämtning av viralt RNA eller DNA.

Olika förstärkningssystem har varierande effektivitet beroende på den totala mängden nukleinsyra som förekommer i reaktionen. Eluat från detta kit innehåller både virala nukleinsyror och bärrar-RNA, och mängden bärrar-RNA överstiger vid mängden virala nukleinsyror. Beräkningar av hur mycket eluat som ska tillsättas till nedströms förstärkningar ska därför baseras på mängden tillsatt bärrar-RNA. För att erhålla högsta känslighetsnivå på förstärkningsreaktionerna kan det bli nödvändigt att justera mängden bärrar-RNA som tillsätts till AL-buffert.













Tillsats av interna kontroller

Om man vill använda QIAamp DSP Virus Spin-protokollet i kombination med kommersiellt tillgängliga förstärkningssystem kan man behöva införa en intern kontroll i reningsprocessen. Internt kontroll-RNA eller -DNA ska tillsättas tillsammans med bärrar-RNA till lyseringsbufferten. För optimal reningseffektivitet ska de interna kontrollmolekylerna inte vara längre än 200 nukleotider, då mindre molekyler inte återhämtas på ett effektivt sätt.

Se tillverkarens anvisningar för att fastställa optimal koncentration. Om man använder en annan koncentration än vad som rekommenderas kan förstärkningens effektivitet försämrast.

Material som medföljer

Kitets innehåll

QIAamp DSP Virus Spin-kit			
Katalognr.			61704
Antal provpreparat			50 [§]
	QIAamp QIAamp MinElute Columns with Wash MinElute Tubes (WT) (QIAamp MinElute-kolonner med tvättrör) (2 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Lyseringsrör) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Elueringsrör) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Tvättrör) (2 ml)		5 x 50
AL	Lysis Buffer* (Lyseringsbuffert)		33 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (Tvättbuffert 1 [koncentrat])		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 [†] (concentrate) (Tvättbuffert 2 [koncentrat])		13 ml
AVE	Elution Buffer [‡] (purple caps) (Elueringsbuffert [lila lock])		4 x 2 ml
PS	Protease Solvent [‡] (Proteaslösningsmedel)		4,4 ml
Carrier	Carrier RNA (red caps) (Bärrar-RNA [röda lock])		310 µg
QP	QIAGEN Protease [‡] (QIAGEN-proteas)		1 flaska
	Handbok		1

* Innehåller kaotropiskt salt. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering. Får ej komma i kontakt med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. För ytterligare information, se sid. 11.

[†] Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

[‡] Se "Beredning av reagens och buffertar", sidan 15.

[§] Om QIAamp DSP Virus Spin-kitet automatiseras på QIAcube-instrumentet, kan instrumentet eventuellt bearbeta färre än 50 prover på grund av dödvolymer, avdunstning och ytterligare reagensförbrukning genom automatiserad pipettering. QIAGEN garanterar endast 50 provberedningar vid manuell användning av QIAamp DSP Virus Spin-kitet.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpliga säkerhetsdatablad (SDS) för ytterligare information, vilka kan erhållas av respektive tillverkare.

- Etanol (96–100 %)*
- Pipetter[†] och pipettspetsar (för att undvika korskontamination rekommenderar vi bestämt att pipettspetsar med aerosolbarriärer används)
- Värmeblock[†] för lysering av proverna vid 56 °C
- Mikrocentrifug[†] (med rotor för 1,5 ml och 2 ml provrör)
- Vortex
- För prover <200 µl: 0,9 % NaCl-lösning

* Använd inte denaturerad alkohol, som innehåller andra substanser, exempelvis metanol eller metyletylketon.

[†] För att säkerställa att proverna bearbetas ordentligt under processerna i QIAamp DSP Virus Spin-kitet rekommenderar vi bestämt att instrumenten (t.ex. pipetter och värmeblock) kalibreras i enlighet med tillverkarnas rekommendationer.

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpliga säkerhetsdatablad (SDS) för ytterligare information. Dessa är tillgängliga online i praktiskt och kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, där du finner och kan skriva ut datablad för materialsäkerhet för alla QIAGEN-kit och kitkomponenter.



WARNING: TILLSÄTT INTE blekmedel eller sura lösningar direkt till avfall som innehåller AL-buffert eller AW1-buffert.

AL-buffert och AW1-buffert innehåller guanidinhydroklorid som kan bilda starkt reaktiva sammansättningar i kombination med blekmedel. Om vätska innehållande dessa buffertar spills måste detta torkas upp med lämpligt laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den utspillda vätskan innehåller potentiellt infektiösa agens, skall ytan först rengöras med rengöringsmedel och vatten, och därefter med 1 % (v/v) natriumhypoklorid.

Om buffertflaskorna är skadade eller läcker ska du använda skyddshandskar och skyddsglasögon när du kasserar flaskorna för att undvika personlig skada eller skada på andra.

QIAGEN har inte testat vätskeavfallet som genereras av QIAamp DSP Virus Spin-proceduren för resterande smittbärande material. Kontamination av vätskeavfallet med resterande smittbärande material är mycket osannolikt, men kan inte helt uteslutas. Vätskeavfall måste därför anses vara smittbärande och hanteras och kasseras enligt lokala säkerhetsföreskrifter.

Följande riskhänvisningar och säkerhetsfraser (R- och S-fraser) gäller för komponenterna i QIAamp DSP Virus Spin-kitet:

Följande information om risker och försiktighetsåtgärder gäller komponenter till QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Buffer AL



Innehåller: guanidinhydroklorid; maleinsyra. Varning! Kan vara skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan orsaka allergisk hudreaktion. Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp. Ta av nedstänkta kläder och tvätta dem innan de används igen. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

Buffer AW1



Innehåller: guanidinhydroklorid. Varning! Skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare om du mår dåligt. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. Ta av nedstänkta kläder och tvätta dem innan de används igen. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

QIAGEN Protease



Innehåller: Subtilisin. Fara! Orsakar lätt hudirritation. Orsakar allvarliga ögonskador. Kan orsaka allergi- eller astmasymtom eller andningssvårigheter vid inandning. Undvik att andas in damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Innehållet/behållaren lämnas till godkänd avfallsanläggning. Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID INANDNING: Flytta personen till frisk luft och se till att andningen underlättas. Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd.

Förvaring och hantering av reagens

QIAamp MinElute-kolonnerna ska förvaras vid 2–8 °C vid ankomsten.

All buffert kan förvaras vid rumstemperatur (15–25 °C).

Frystorkat bärar-RNA kan förvaras vid rumstemperatur (15–25 °C) fram till det utgångsdatum som står angivet på kartongen med kitet. Bärar-RNA kan endast lösas upp i AVE-buffert, löst bärar-RNA ska omedelbart tillsättas AL-buffert enligt beskrivningen på sidan 15. Denna lösning ska beredas färsk, och är hållbar vid 2–8 °C i upp till 48 timmar. Oanvända delar av bärar-RNA upplöst i AVE-buffert ska frysas i aliquoter vid –30 till –15 °C.

Frystorkat QIAGEN proteas (QP) kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C) fram till kitets utgångsdatum utan att dess prestanda påverkas.

QIAGEN proteas (QP) som rekonstituerats i proteaslösningsmedel (PS) är hållbart i upp till ett år vid förvaring vid 2–8 °C, men endast fram till kitets utgångsdatum. Förvaring av QIAGEN proteas-stamlösning i rumstemperatur under långa tidsperioder bör undvikas.

Rekonstituerad tvättbuffert 1 (AW1) och rekonstituerad tvättbuffert 2 (AW2) är hållbara i upp till 1 år när de förvaras i rumstemperatur (15–25 °C), men bara fram till utgångsdatumet på kitlådan.

Förvaring och hantering av prover

Efter provtagning och centrifugering kan plasma eller serum förvaras vid 2–8 °C i upp till 6 timmar. För långvarig förvaring rekommenderas frysning vid –20 °C eller –80 °C i aliquoter. Frysta plasma- eller serumprover får inte tinas upp mer än en gång. Upprepad infrysning-upptining leder till denaturering och utfällning av proteiner, vilket kan resultera i minskade virala titrer och därmed minskat utbyte av virala nukleinsyror. Dessutom kan frystorkningsutfällningar som bildas under frysning-upptining sätta igen QIAamp MinElute-membranet. Om frystorkningsutfällningar är synliga kan de pelleteras genom centrifugering vid cirka 6800 x g i 3 minuter. Den klarnade supernatanten ska avlägsnas och bearbetas omedelbart utan att rubba pelleten.

Förfarande

Viktigt att tänka på före start

- Kontrollera efter mottagandet att kitkomponenterna inte är skadade. Om blisterförpackningarna eller buffertflaskorna är skadade, kontakta QIAGEN teknisk service eller din lokala distributör. Om vätska har spillts ut, se "Varningar och försiktighet" (sid. 11). Använd inte skadade kitkomponenter, eftersom det kan leda till att kitet fungerar dåligt.
- Använd alltid utrustning som är fri från RNase.
- Byt alltid pipettspetsar mellan vätskeöverföringarna. För att minimera korskontaminering rekommenderar vi att pipettspetsar med aerosolbarriär används.
- Samtliga centrifugeringssteg ska utföras vid rumstemperatur (15–25 °C).
- Använd alltid engångshandskar och kontrollera regelbundet att de inte är kontaminerade med provmaterial. Kassera handskar som blir kontaminerade.
- För att minimera korskontaminering ska endast ett rör i taget öppnas.
- Använd inte komponenter från andra kit tillsammans med de kit du använder för närvarande, om de inte har samma lotnummer.
- Undvik mikrobiell kontaminering av kitreagenserna.
- För att med säkerhet undvika potentiellt smittsamt material, rekommenderar vi att du arbetar i förhållanden med laminärt luftflöde tills proverna är lyserade.
- Detta kit ska endast användas av personal med utbildning i in vitro-diagnostik på laboratorium.

Hantering av QIAamp MinElute-kolonner

På grund av nukleinsyreförstärkningsteknikens höga sensitivitet är följande försiktighetsåtgärder nödvändiga vid hantering av QIAamp MinElute-kolonner för att förhindra korskontamination mellan provberedningarna:

- Applicera försiktigt provet eller lösningen till QIAamp MinElute-kolonnen. Pipettera provet i QIAamp MinElute-kolonnen utan att blöta ned kolonnens kant.
- Byt pipettspetsar mellan alla vätskeöverföringar. Användning av pipettspetsar med aerosolbarriär rekommenderas.
- Undvik att vidröra QIAamp MinElute-membranet med pipettspetsen.
- Efter pulsvortexsteget ska mikrocentrifugrören centrifugeras kortvarigt för att avlägsna droppar från lockets insida.

- Använd laboratoriehanskar under hela processen. Om handskarna kommer i kontakt med provet skall de genast bytas ut.

Centrifugering

- Tvättrör och elueringsrör för alla centrifugeringssteg medföljer kitet.
- Centrifugering av QIAamp MinElute-kolonnerna görs vid cirka 6000 x g för att minska centrifugljudet. Att centrifugera QIAamp MinElute-kolonnerna med full hastighet påverkar inte DNA- eller RNA-utbytet.
- För den torra snurrningen i slutet av tvättprocessen samt för eluering ska centrifugering utföras vid full hastighet.
- Samtliga centrifugeringssteg ska utföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

Bearbetning av QIAamp MinElute-kolonner i en mikrocentrifug

- Stäng QIAamp MinElute-kolonnen innan du placerar den i mikrocentrifugen. Centrifugera enligt beskrivningen.
- Ta bort QIAamp MinElute-kolonnen och tvättröret från mikrocentrifugen.
- Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett nytt tvättrör. Kassera filtratet och tvättröret. Observera att filtratet kan innehålla skadligt avfall och ska kasseras på lämpligt sätt.
- Öppna endast en QIAamp MinElute-kolonn åt gången och undvik aerosolbildning.

För en effektiv parallell bearbetning av flera prover rekommenderar vi att ett ställ fylls med tvättrör, så att QIAamp MinElute-kolonnerna kan överföras efter centrifugeringen. Använda tvättrör som innehåller filtrat kan kasseras, och de nya tvättrören som innehåller QIAamp MinElute-kolonner kan placeras direkt i mikrocentrifugen.

Beredning av reagens och buffertar

- Beredning av RNA

Vid beredning av viralt RNA ska du genomföra de manuella stegen i processen snabbt och läsa Bilagan på sidan 25 innan du börjar.

- Preparering av QIAGEN proteas

Tillsätt hela innehållet i flaskan med 4,4 ml proteaslösningsmedel (PS) till flaskan med frystorkad QIAGEN proteas (QP) och blanda noga. För att undvika skumbildning ska du blanda genom att vända flaskan flera gånger. Se till att QIAGEN proteas (QP) löses helt.



Tillsätt inte QIAGEN proteas (QP) direkt till buffert-AL.*

QIAGEN proteas (QP) som har rekonstituerats i proteaslösningsmedel (PS) är hållbart i upp till ett år vid förvaring vid 2–8 °C, men endast fram till kitets utgångsdatum. Förvaring av QIAGEN proteas-lösning i rumstemperatur under långa tidsperioder bör undvikas.

■ Tillsätta bärar-RNA till AL-buffert*

Tillsätt 310 µl AVE-buffert till röret som innehåller 310 µg frystorkat bärar-RNA för att erhålla en lösning med 1 µg/µl. Lös upp bärar-RNA:t noga, dela upp det i lämpliga alikvoter och förvara vid –25 °C till –15 °C. Undvik att frysa och tina upp alikvoterna med bärar-RNA mer än 3 gånger.



Det går inte att lösa upp bärar-RNA i AL-buffert. Det måste först lösas upp i AVE-buffert, och därefter tillsättas till AL-buffert.

Beräkna den volym av blandningen av AL-buffert och bärar-RNA som behövs per provsats genom att välja antalet prover som ska bearbetas samtidigt i tabell 1 på sidan 17. Vid större antal prover kan volymerna beräknas med hjälp av provberäkningen nedan:

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

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

där: **n** = antalet prover som ska bearbetas samtidigt

y = beräknad volym AL-buffert

z = den volym bärar-RNA-AVE-buffert som ska tillsättas till AL-buffert

Blanda försiktigt genom att vända röret 10 gånger. Använd inte vortex för att undvika skumbildning.

* Innehåller kaotropiskt salt. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering. Får ej komma i kontakt med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. Se sid. 11 säkerhetsinformation.

Tabell 1. Volymer (Vol.) av blandningen av AL-buffert och bärar-RNA-AVE-buffert som krävs för specifika antal prover för QIAamp DSP Virus Spin-processen


Antal prover	Vol. AL-buffert (ml)	Vol. bärar-RNA-AVE (µl)	Antal prover	Vol. AL-buffert (ml)	Vol. bärar-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



Provprepareringsproceduren är optimerad för 5,6 µg bärar-RNA per prov. Om mindre bärar-RNA har visat sig vara bättre för ditt förstärkningssystem ska endast erforderlig mängd upplöst bärar-RNA överföras till provrören med AL-buffert. För varje mikrogram bärar-RNA som krävs per preparering ska 5 µl AVE-buffert-upplöst bärar-RNA tillsättas per milliliter AL-buffert. Användning av mindre än 5,6 µg bärar-RNA per prov måste valideras för varje specifik provtyp och nedströms analys.


AW1-buffert*

Tillsätt 25 ml etanol (96–100 %) till en flaska innehållande 19 ml AW1-buffert-koncentrat enligt beskrivningen på flaskan. Markera kryssrutan på etiketten för att visa att etanol har tillsatts. Förvara rekonstituerad AW1-buffert vid rumstemperatur (15–25 °C). Rekonstituerad AW1-buffert är hållbar i upp till ett år vid förvaring vid rumstemperatur, men endast fram till kitets utgångsdatum.

 Blanda alltid rekonstituerad AW1-buffert genom att skaka den innan du startar processen.

AW2-buffert†

Tillsätt 30 ml etanol (96–100 %) till en flaska innehållande 13 ml AW2-buffert-koncentrat enligt beskrivningen på flaskan. Markera kryssrutan på etiketten för att visa att etanol har tillsatts. Förvara rekonstituerad AW2-buffert vid rumstemperatur (15–25 °C). Rekonstituerad AW2-buffert är hållbar i upp till ett år vid förvaring vid rumstemperatur, men endast fram till kitets utgångsdatum.

 Blanda alltid rekonstituerad AW2-buffert genom att skaka den innan du startar processen.

Eluering av nukleinsyror

Elueringsbuffert ska ekvibreras till rumstemperatur innan den tillförs till kolonnen. Utbytet ökar om QIAamp MinElute-kolonnen inkuberas med elueringsbufferten vid rumstemperatur i 5 minuter före centrifugeringen.

* Innehåller kaotropiskt salt. Vidta lämpliga säkerhetsåtgärder och använd handskar vid hantering. Får ej komma i kontakt med desinfektionsmedel som innehåller blekmedel. Se säkerhetsinformationen på sidan 11.

† Innehåller natriumazid som konserveringsmedel.

Protokoll: Rening av virala nukleinsyror från plasma eller serum

Detta protokoll är avsett för rening av virala nukleinsyror från 200 μ l plasma eller serum med användning av QIAamp DSP Virus Spin-kitet och en mikrocentrifug. Se användarmanualen till QIAcube (*QIAcube User Manual*) och relevanta protokollblad för automatiserad rening med användning av QIAamp DSP Virus Spin-kitet och QIAcube.

Viktigt att tänka på före start


- Samtliga centrifugeringssteg ska utföras vid rumstemperatur (15–25 °C).

Saker som bör göras före start

- Ekvilibrera proverna till rumstemperatur (15–25 °C).
- Ekvilibrera AVE-buffert till rumstemperatur för eluering i steg 14.
- Sätt ett värmeblock på 56 °C \pm 3 °C för användning i steg 4.
- Se till att AW1-buffert, AW2-buffert och QIAGEN proteas (QP) har preparerats i enlighet med anvisningarna på sidorna 15–18.
- Tillsätt bärar-RNA rekonstituterat i AVE-buffert till AL-buffert i enlighet med anvisningarna på sidan 15.

Förfarande

1. Pipettera 25 μ l QIAGEN proteas (QP) i ett lyseringsrör (LT).

-  Läs "Beredning av reagens och buffertar" på sidan 15 för information om resuspendering av QIAGEN proteas (QP) i proteaslösningsmedel.

2. Tillsätt 200 μ l plasma eller serum till lyseringsröret (LT).

Om provvolymen är mindre än 200 μ l ska lämplig volym 0,9 % natriumkloridlösning tillsättas för en total volym av proteas och prov på 225 μ l.

3. Tillsätt 200 μ l AL-buffert (innehållande 28 μ g/ml bärar-RNA). Stäng locket och blanda i pulsvortex i \geq 15 sekunder.

För att säkerställa effektiv lysering är det viktigt att provet och AL-bufferten blandas noga för att få fram en homogen lösning.

-  Tillsätt inte QIAGEN proteas (QP) direkt till buffert-AL.

4. Inkubera vid 56 °C \pm 3°C i 15 minuter \pm 1 minut i ett värmeblock.

5. **Centrifugera lyseringsröret (LT) som hastigast för att avlägsna droppar från lockets insida.**
6. **Tillsätt 250 µl etanol (96–100 %) till provet, stäng locket och blanda noga i puls-vortex i ≥ 15 sekunder. Inkubera lysatet med etanolen i 5 minuter \pm 30 sekunder i rumstemperatur (15–25 °C).**



Om rumstemperaturen är högre än 25 °C ska etanolen kylas på is innan den tillsätts lysatet.

7. **Centrifugera provröret som hastigast för att avlägsna droppar från lockets insida.**
8. **Applicera försiktigt allt lysat från steg 7 i QIAamp MinElute-kolonnen utan att blöta ned kanten. Stäng locket och centrifugera vid cirka 6000 x g i > 1 minut. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (WT), och kassera det tvättrör som innehåller filtratet.**

Om lysatet inte har passerat helt igenom kolonnen efter centrifugeringen ska du centrifugera på nytt vid en högre hastighet tills QIAamp MinElute-kolonnen är tom.

9. **Öppna försiktigt QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 500 µl AW1-buffert utan att blöta ned kanten. Stäng locket och centrifugera vid cirka 6000 x g i ≥ 1 minut. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (WT), och kassera det tvättrör som innehåller filtratet.**
10. **Öppna försiktigt QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 500 µl AW2-buffert utan att blöta ned kanten. Stäng locket och centrifugera vid cirka 6000 x g i > 1 minut. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör, och kassera det tvättrör som innehåller filtratet.**
11. **Öppna försiktigt QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 500 µl etanol (96–100 %) utan att blöta ned kanten. Stäng locket och centrifugera vid cirka 6000 x g i > 1 minut. Kassera det tvättrör som innehåller filtratet.**

Korsöverföring av etanol till eluatet kan orsaka problem för nedströms applikationer. Vissa centrifugrotorer kan vibrera vid inbromsningen, vilket kan leda till att genomflöde som innehåller etanol kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen. Borttagning av QIAamp MinElute-kolonnen och tvättröret från rotorn kan också orsaka att genomflöde kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen.

12. **Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett rent 2 ml tvättrör (WT). Centrifugera vid full hastighet (cirka 20 000 x g) i 3 minuter \pm 30 sekunder för att torka membranet helt.**

- 13. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett nytt 2 ml tvättrör (WT), öppna locket och inkubera enheten vid $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 3 minuter \pm 30 sekunder för att torka membranet helt.**

Detta steg leder till avdunstning av eventuell kvarvarande vätska.

- 14. Placera QIAamp MinElute-kolonnen i ett elueringsrör (ET), och kassera det tvättrör som innehåller filtratet. Öppna försiktigt locket på QIAamp MinElute-kolonnen och tillsätt 20–150 μl AVE-buffert mitt på membranet. Stäng locket och inkubera vid rumstemperatur i 5 minuter. Centrifugera vid full hastighet (cirka 20 000 x g) i >1 minut.**



Se till att elueringsbufferten ekvilibreras till rumstemperatur. Om elueringen görs i små volymer (<50 μl) måste elueringsbufferten dispenseras mitt på membranet för fullständig eluering av bundet RNA och DNA.

Elueringsvolymen är flexibel och kan anpassas efter behoven hos nedströms applikationer. Kom ihåg att den återhämtade elueringsvolymen kommer att vara ungefär 5 μl mindre än den elueringsbuffertvolym som applicerades i kolonnen.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lot av QIAamp DSP Virus Spin-kitet med fastställda specifikationer enligt QIAGEN:s ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Begränsningar

Systemets prestanda har fastställts med användning av plasma- och serumprover för isolering av virala nukleinsyror.

Det är användarens ansvar att validera systemets prestanda för eventuella processer som används i deras laboratorium som inte täcks av QIAGENs prestandastudier.

För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat bör lämpliga kontroller för påföljande applikationer användas. För ytterligare validering rekommenderas riktlinjerna enligt the International Conference on Harmonisation of Technical Requirements (ICH) i ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska eller laboratoriefynd.

Prestandaegenskaper

Se www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance angående prestandaegenskaper för QIAamp DSP Virus Spin-kitet.

Referenser

QIAGEN upprätthåller en stor, uppdaterad databas online med vetenskapliga publikationer som använder QIAGEN-produkter. Omfattande sökalternativ gör att du kan hitta de artiklar du behöver, antingen genom en enkel nyckelordssökning eller genom att specificera applikation, forskningsområde, titel, etc.

För en fullständig lista över referenser, besök QIAGEN referensdatabas online på www.qiagen.com/RefDB/search.asp eller kontakta QIAGEN:s tekniska support eller din lokala distributör.

Symboler



<N>

Innehåller reagenser som räcker för <N> provberedningar



Konsultera bruksanvisningen



Använd före



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Katalognummer



Viktig anmärkning



Lotnummer



Materialnummer



Komponenter



Volym



Temperaturbegränsningar



Tillverkare



Vid ankomst



Öppnas vid leveransen, förvara QIAamp MinElute-kolonner vid 2–8 °C



Skriv ner aktuellt datum efter att ha tillsatt etanol i flaskan



Tillsätt



Innehåller

LYOPH	Frystorkat
RCNS	Rekonstituera vid
EtOH	Etanol
GuHCl	Guanidinhydroklorid
MALEIC ACID	Maleinsyra
SUBT	Subtilisin
GTIN	GS1-artikelnummer (Global Trade Item Number)
→	Leder till

Kontaktinformation

Vi på QIAGEN är stolta över vår tekniska supports kvalitet och tillgänglighet. Våra tekniska serviceavdelningar är bemannade med erfarna vetenskapsmän med omfattande praktisk och teoretisk expertis inom molekylärbiologi och användningen av QIAGEN-produkter. Kontakta oss om du har frågor eller problem med QIAamp DSP Virus Spin-kitet eller QIAGEN-produkter i allmänhet.

QIAGEN-kunder är en viktig informationskälla beträffande avancerad eller specialiserad användning av våra produkter. Denna information är användbar såväl för andra vetenskapsmän som för forskarna på QIAGEN. Vi uppmanar dig därför att kontakta oss om du har några förslag om produktprestanda eller nya applikationer och metoder.

För teknisk hjälp och ytterligare information, besök vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support eller ring en av QIAGEN tekniska serviceavdelningar eller lokala distributörer (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

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

Bilaga

Arbete med RNA

Ribonukleaser (RNase) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att vara aktiva. RNaser är svåra att inaktivera och endast en liten mängd räcker för att bryta ner RNA. Därför skall inga laboratiematerial av glas eller plast användas, där RNase-kontaminationer inte eliminerats först. Var noga med att se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter isoleringsförfarandet. För att skapa och bevara en RNase-fri omgivning bör de påföljande försiktighetsåtgärderna följas vid förbehandling och bruk av engångs- och flergångsbehållare och lösningar när du arbetar med RNA.

Allmän hantering

Arbetet med RNA skall alltid följa korrekta principer för mikrobiologiska och aseptiska arbetstekniker. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontamination. Bär därför alltid latex- eller vinylhanskar vid hantering av reagenser eller RNA-prov för att undvika en RNase-kontamination via huden eller genom dammiga laboratorieinstrument. Byt laboratoriehandskarna ofta och håll provrören stängda.

Plastartiklar som inte är avsedda för engångsbruk


Plastartiklar som inte är avsedda för engångsbruk ska behandlas före användningen för att säkerställa att de är fria från RNase. Plastartiklar ska sköljas noga med 0,1 M NaOH,* 1 mM EDTA* följt av RNase-fritt vatten* (se "Lösningar", sidan 26). Alternativt kan kloroformtåliga plastartiklar sköljas med kloroform* för att inaktivera RNase.

Glasartiklar

Glasartiklar ska behandlas före användningen för att säkerställa att de är fria från RNase. Glasartiklar som ska användas för RNA-arbete ska rengöras med rengöringsmedel, sköljas noga och ugsnbakas i >240 °C i minst fyra timmar (över natten, om det är mer bekvämt) före användningen. Enbart autoklaving kommer inte helt att inaktivera många RNaser. Ugsnbakning inaktiverar både

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpliga säkerhetsdatablad (SDS) för ytterligare information, vilka kan erhållas av respektive tillverkare.

ribonukleaser och säkerställer att inga andra nukleinsyror (exempelvis plasmid-DNA) finns kvar på glasytan. Alternativt kan glaset behandlas med DEPC* (dietylpyrokarbonat). Täck över glaset med 0,1 % DEPC i vatten över natten (12 timmar) vid 37 °C, och autoklavera sedan eller värm till 100 °C i 15 minuter för att avlägsna alla rester av DEPC.

 Corex®-rör ska göras RNase-fria genom behandling med DEPC och inte genom ugsbakning. Detta minskar felfrekvensen för denna typ av rör under centrifugeringen.

Elektroferestankar

Elektroferestankar ska rengöras med rengöringslösning (t.ex. 0,5 % SDS),* sköljas med vatten, torkas med etanol,*[†] och därefter fyllas med en lösning av 3 % väteperoxid.* Efter 10 minuter i rumstemperatur ska elektroferestankarna sköljas noga med RNase-fritt vatten.

Lösningar

Lösningar (vatten och andra lösningar) ska behandlas med 0,1 % DEPC. DEPC reagerar med primäraminerna och kan inte användas direkt för att behandla Tris-buffertar. DEPC är mycket instabilt i närvaro av Tris-buffert och bryts snabbt ned till etanol och CO₂. Vid preparering av Tris-buffertar ska vattnet först behandlas med DEPC, och därefter ska Tris lösas upp för att bilda lämplig buffert.

DEPC är en stark, men inte en absolut, hämmare av RNaser. Det används ofta vid en koncentration av 0,1 % för att inaktivera RNaser på glas eller plast, eller för att bilda RNase-fria lösningar och vatten. DEPC inaktiverar RNaser genom kovalent modifiering. Spårbara mängder DEPC modifiera purina rester i RNA genom karboxylering. Karboxylerat RNA förflyttas med mycket låg effektivitet i cellfria system. Dess förmåga att bilda DNA:RNA- eller RNA:RNA-hybrider påverkas emellertid inte allvarligt, såvida inte en stor fraktion av purina rester har modifierats. Rester av DEPC måste alltid avlägsnas från lösningar och kärl genom autoklavering eller uppvärmning till 100 °C ± 3 °C i 15 minuter ± 1 minut.

* Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpliga säkerhetsdatablad (SDS) för ytterligare information, vilka kan erhållas av respektive tillverkare.

[†] Den plast som används i vissa elektroferestankar är inte motståndskraftig mot etanol. Vidta lämpliga försiktighetsåtgärder och kontrollera leverantörens anvisningar.

Tillsätt 0,1 ml DEPC till 100 ml av den lösning som ska behandlas och skaka kraftigt för att blanda DEPC i lösningen eller låt lösningen inkubera i >12 timmar vid $37\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Autoklavera i 15 ± 1 minut för att avlägsna alla spår av DEPC. Det kan vara önskvärt att testa vattenkällorna för närvaro av kontaminerande RNaser, eftersom många källor till destillerat vatten är fria från RNase-aktivitet.

ⓘ Buffertarna i QIAamp DSP Virus Spin-kitet behandlas inte med DEPC för att bli RNase-fria, och är därför fria från DEPC-kontamination.

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

Registrerade namn, varumärken mm. som används i detta dokument, även när de inte uttryckligen har markerats som sådana, får inte betraktas som oskyddade i lag.

Begränsat licensavtal för QIAamp DSP Virus Spin-kit

Användning av denna produkt innebär att köparen eller användaren av QIAamp DSP Virus Spin-kitet godkänner följande villkor:

1. QIAamp DSP Virus Spin-kitet får endast användas i enlighet med handboken för QIAamp DSP Virus Spin-kitet och endast med komponenter som finns i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte är inkluderade i detta kit, förutom det som beskrivs i handboken för QIAamp DSP Virus Spin-kitet och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Detta kit och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, renoveras eller säljas vidare.
4. QIAGEN avsägar sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
5. Köparen och användaren av kitet åtar sig att inte tillåta någon annan att utföra något som kan leda till eller orsaka otillåtna situationer som beskrivs ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol, och skall ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuellt försök att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av sina immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

© 2015 QIAGEN, med ensamrätt.

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

