

Únor 2017

List protokolu QIAsymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V1 a
circDNA_4000_DSP_V1

Tento dokument je Listem protokolu QIAsymphony circDNA_2000_DSP_V1 a
circDNA_4000_DSP_V1, verze 1, R1

Všeobecné informace

Pro diagnostické použití in vitro.

Tento protokol je určen k purifikaci lidské cirkulující bezbuněčné DNA z čerstvé nebo zmrazené lidské plazmy a moči pomocí přístroje QIAasymphony DSP a sady QIAasymphony DSP Circulating DNA.

Sada	Sada QIAasymphony DSP Circulating DNA (katalogové číslo 937556)
Materiál vzorku	Lidská plazma: Antikoagulovaná EDTA nebo citrátem nebo stabilizovaná ccfDNA Lidská moč: nestabilizovaná nebo stabilizovaná
Název protokolu	circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1
Výchozí množina analytických kontrol	ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1
Eluční objem	60 µl
Vyžadovaná verze softwaru	Verze 4.0.3 nebo vyšší

Zásuvka „Sample“

Typ vzorku	Lidská plazma (viz „Příprava materiálu vzorků“) a Lidská moč (stabilizovaná nebo nestabilizovaná)
Objem vzorku	Závisí na typu použité zkumavky na vzorek Pro další informace viz seznam laboratorního vybavení, který můžete nalézt ve zdrojové tabulce na stránce o produktu www.qiagen.com .
Zkumavky na primární vzorek	Neuvedeno
Zkumavky na sekundární vzorek	Pro další informace viz seznam laboratorního vybavení, který můžete nalézt ve zdrojové tabulce na stránce o produktu www.qiagen.com .
Vložky	Neuvedeno
Jiné	Je potřeba přidat proteinázu K do drážky A, pozice 1 a/nebo 2).

n/a = neuvedeno.

Příprava proteinázy K v zásuvce „Sample“

Sada QIAasymphony DSP Circulating DNA obsahuje roztok proteinázy K připravený k použití, který se může skladovat při pokojové teplotě.

Poznámka: Zkumavky obsahující proteinázu K jsou umístěny v nosiči zkumavek. Zkumavka(y) obsahující proteinázu K musí být umístěna(y) na pozici 1 a/nebo 2 v drážce A zásuvky „Sample“.

Pro požadovaný typ zkumavky viz seznam laboratorního vybavení, který můžete nalézt ve zdrojové tabulce na stránce o produktu www.qiagen.com.

Počet vzorků*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11,660 ml†
96	11,660 ml	22,220 ml†

* Pro každou zkumavku se vyžaduje 110 µl pro circDNA_2000_DSP nebo 220 µl pro circDNA_4000_DSP, plus doplňkový molární objem 1100 µl [(n x 110 nebo 220 µl) + 1100 µl].

† Pro circDNA_4000_DSP: Pokud se zpracovává více než 48 vzorků, použijte druhou zkumavku. Maximální objem zatížení na zkumavku je 11,660 µl. Pro druhou zkumavku je vyžadován doplňkový molární objem 1100 µl.

Zásuvka „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební díly)

Poloha A1 a/nebo A2	Zásobník s reagensy
Poloha B1	Neuvedeno
Držák se stojánkem pro špičky 1-18	Filtrační špičky k jednorázovému použití 200 µl nebo 1500 µl
Držák jednotkové krabice 1–4	Jednotkové krabice obsahující vzorové preparáty nebo 8tyčové kryty

n/a = neuvedeno.

Zásuvka „Waste“ (Odpad)

Držák jednotkové krabice 1–4	Prázdné jednotkové krabice
Držák odpadních sáčků	Odpadní sáček
Držák lahve na kapalný odpad	Prázdna lahev na kapalný odpad

Zásuvka „Eluate“ (Eluát)

Eluční stojánek (doporučuje se použít chladicí pozici, drážka 1)	Pro další informace viz seznam laboratorního vybavení, který můžete nalézt ve zdrojové tabulce na stránce o produktu www.qiagen.com .
---	---

Požadované plastové vybavení

Protokol circDNA_2000_DSP

Umělohmotný materiál	Jedna sada 24 vzorků*	Dvě sady 48 vzorků*	Čtyři sady 96 vzorků*
Jednorázové špičky s filtrem, 200 µl†‡	24	48	96
Jednorázové špičky s filtrem, 1500 µl†‡	64	120	232
Zásobníky pro přípravu vzorků§	15	30	60
8tyčové kryty¶	3	6	12

* Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet filtračních špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden běh.

† Je zde 32 filtračních špiček/stojánek na filtrační špičky.

‡ Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 snímek inventáře na kazetu s reagensy.

§ Je tu 28 kazet s preparáty vzorku/jednotková krabice.

¶ Je tu dvanáct 8tyčových krytů/jednotková krabice.

Protokol circDNA_4000_DSP

Umělohmotný materiál	Jedna sada 24 vzorků*	Dvě sady 48 vzorků*	Čtyři sady 96 vzorků*
Jednorázové špičky s filtrem, 200 µl†‡	24	48	96
Jednorázové špičky s filtrem, 1500 µl†‡	104	200	392
Zásobníky pro přípravu vzorků§	18	36	72
8tyčové kryty¶	3	6	12

* Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet filtračních špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden běh.

† Je zde 32 filtračních špiček/stojánek na filtrační špičky.

‡ Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 snímek inventáře na kazetu s reagensy.

§ Je tu 28 kazet s preparáty vzorku/jednotková krabice.

¶ Je tu dvanáct 8tyčových krytů/jednotková krabice.

Poznámka: Udávaný počet filtračních špiček se liší od počtu, který je zobrazen na dotykové obrazovce v závislosti na nastaveních. Doporučuje se načíst maximální možný počet špiček.

Eluční objem

Vybraný eluční objem	Výchozí eluční objem
60 µl	75 µl

Eluční objem se vybírá na dotykové obrazovce. Průměr elučního objemu, který je k dispozici, činí ≥ 60 µl. V jednotlivých případech může být konečný objem eluátu pro jednotlivé zkumavky až o 5 µl menší než vybraný objem (např. 55 µl). Doporučujeme zkontrolovat aktuální objem eluátu při používání systému automatického nastavení kvantitativní analýzy, který před přenosem neověřuje eluční objem.

Uchovávání eluátů

Doporučuje se vyjmout eluační destičku ze zásuvky "Eluate" ihned poté, co protokol skončil. Eluční destičky mohou být po skončení protokolu ponechány v přístroji QIASymphony SP přes noc (maximálně 16 hodin včetně doby protokolu; doporučené podmínky v prostředí:

18–26 °C a 20–75 % relativní vlhkost). V závislosti na teplotě a vlhkosti mohou eluáty podlehnout kondenzaci nebo evaporaci.

Po přípravě vzorku lze eluáty skladovat při teplotě 2–8 °C až po dobu 1 měsíce. Pro dlouhodobé skladování mohou být eluáty uskladněny při –20 °C nebo při –80 °C. Zmražené vzorky eluátů se nesmí roztavit více než třikrát.

Příprava materiálu vzorků

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

Důležité body, než začnete

- Zamezte vytvoření pěny na vzorcích nebo v nich.
- Vzorky by měly být před začátkem protokolu ekvilibrovány na pokojovou teplotu (15–25 °C).

Lidská plazma

Vzorky krve ošetřené EDTA nebo citrátem jako antikoagulantem mohou být použity pro přípravu plazmy. Může být také použita plazma připravená ze zkumavek na odběr stabilizované krve s ccfDNA. Plazma je generována přesně tak, jak stanovil uživatel.

Doporučuje se provést oddělení plazmy ihned po odběru krve za použití EDTA nebo citrátu jako antikoagulantu.

V případě některých dalších aplikací může být nezbytné vyloučit nebo snížit na minimum nukleové kyseliny z váčků. V těchto případech se doporučuje provést po výchozím generování plazmy vysokorychlostní centrifugaci při 16,000 x g po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C).

Po provedení odběru a centrifugace je možné uchovávat plazmu při pokojové teplotě po dobu až 7 dní a při teplotě 2–8 °C až po dobu 14 dní. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje zmrazit aliquotní podíly při –20 °C nebo při –80 °C. Zmražené plazma se nesmí roztavit více než třikrát. Opakované zmrazování a roztavení vede k denaturaci a precipitaci proteinů, což může potenciálně vést ke snížení výtěžku cirkulujících bezbuněčných nukleových kyselin. Pokud jsou ve vzorcích viditelné kryoprecipitáty, centrifugujte při 6,800 x g po dobu 3 minut při pokojové teplotě (15–25 °C) a přeneste supernatanty bez porušení peletu do druhé zkumavky na vzorek (viz seznam laboratorního vybavení, který můžete nalézt ve zdrojové tabulce na stránce o produktu www.qiagen.com). Začněte ihned s purifikační procedurou.

Lidská moč

Kvůli rychlé degradaci cirkulující bezbuněčné DNA po odebrání moči se velmi doporučuje ihned vzorky moči stabilizovat.

Stabilizovaná lidská moč

Stabilizovaná moč může být skladována při pokojové teplotě (15–25 °C) nebo při 2–8 °C až po dobu 7 dnů. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje zmrazit aliquotní podíly při –20 °C nebo při –80 °C.

Stabilizované vzorky moči nevyžadují předzpracování vzorku. Po stabilizaci se doporučuje centrifugovat vzorky moči při nízké rychlosti (1900 x g) po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C), aby se odstranily buňky před extrakcí cirkulující bezbuněčné DNA. Pokud jsou po centrifugaci v supernatantech viditelné precipitáty, zahřejte vzorky na teplotu 25 °C ve vodní lázni, aby došlo k rozpuštění precipitátů. Před zahájením protokolu přeneste stabilizované vzorky moči do sekundární zkumavky na vzorky, a potom tuto zkumavku vložte do nosiče vzorků (viz seznam laboratorního vybavení, který je k dispozici ve zdrojové tabulce na stránce o produktu na www.qiagen.com).

„Nestabilizovaná“ lidská moč

Před začátkem protokolu, který vyžaduje pufr ATL, zkontrolujte, zda se vytvořil v pufru ATL precipitát. Pokud je to nutné, rozpustěte precipitát zahřátím pufru na 70 °C za jemného míchání ve vodní lázni. Odsajte bubliny z povrchu pufru ATL.

Poznámka: Pufr ATL (Pufr ATL, 4 x 50 ml, katalog. č. 939016) není součástí sady QIAasymphony DSP Circulating DNA a musí být objednán samostatně.

Doporučuje se centrifugovat vzorky moči ihned po odběru při nízké rychlosti (1900 x g) po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C), aby se odstranily buňky. Nestabilizované vzorky moči vyžadují předčištění vzorku.

Důležité upozornění: Před začátkem předzpracování vytemperujte vzorky na pokojovou teplotu (15–25 °C).

Důležité upozornění: Centrifugace a předzpracování by se měly provést během 4 hodin od odběru vzorků moči.

- Směs 2500 µl moči (circDNA_2000_DSP) nebo 4500 µl moči (circDNA_4000_DSP) s 250 µl nebo 450 µl pufru ATL v tomto pořadí.
- Inkubujte vzorky při pokojové teplotě (15–25 °C) po dobu 1 hodiny.
- Centrifugujte vzorky při 1900 x g po dobu 10 minut při pokojové teplotě (15–25 °C).
Pokud jsou po centrifugaci v supernatantech viditelné precipitáty, zahřejte vzorky na teplotu 25 °C ve vodní lázni, aby došlo k rozpuštění precipitátů.
- Přeneste supernatanty do sekundární zkumavky na vzorky, potom tuto zkumavku vložte do nosiče vzorků (viz seznam laboratorního vybavení, který je k dispozici ve zdrojové tabulce na stránce o produktu na www.qiagen.com)

Důležité upozornění: Stabilita a integrace cirkulující bezbuněčné DNA je v nestabilizované moči nízká. Doporučuje se naplnit maximálně jednu šarži 24 vzorky na jeden chod sady QIAasymphony, aby se minimalizovala doba, po kterou jsou vzorky moči v přístroji.

Látky narušující stanovení

Vzorky plazmy s vysokou koncentrací gama globulinu (>30 g/l) mohou vést ke sníženému znovuzískání cirkulující bezbuněčné DNA.

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příručce pro sadu QIAGEN nebo příručce uživatele. Příručky k sadám a uživatelské příručky k produktům QIAGEN jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technických služeb QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.
02/2017 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

