

Februar 2017

QIAsymphony[®] SP

Protokollblatt

circDNA_2000_DSP_V1 und
circDNA_4000_DSP_V1

Bei dem vorliegenden Dokument handelt es sich um das Protokollblatt zu QIAsymphony
circDNA_2000_DSP_V1 und circDNA_4000_DSP_V1, Version 1, R1.

Allgemeine Informationen

Für in-vitro-diagnostische Anwendungen.

Dieses Protokoll gilt für die Aufreinigung von zirkulierender zellfreier Human-DNA aus frischen oder gefrorenem Humanplasma und -urin mit dem QIAasymphony SP und dem QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit.

Kit	QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (Kat.-Nr. 937556)
Probenmaterial	Humanplasma: EDTA- oder citratantikoaguliert oder ccfDNA-stabilisiert Humanurin: unstabilisiert oder stabilisiert
Protokollbezeichnung	circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1
Default Assay Control Set	ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1
Elutionsvolumen	60 µl
Erforderliche Softwareversion	Version 4.0.3 oder höher

Schublade „Sample“ (Probe)

Probentyp	Humanplasma (siehe „Preparation of sample material“) und Humanurin (stabilisiert oder unstabilisiert)
Probenvolumen	Abhängig vom verwendeten Probenröhrchentyp Weitere Informationen hierzu können Sie der Labormaterialliste entnehmen, die unter dem Reiter „Resources“ auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar ist.
Primärprobenröhrchen	n. z.
Sekundärprobenröhrchen	Weitere Informationen hierzu können Sie der Labormaterialliste entnehmen, die unter dem Reiter „Resources“ auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar ist.
Einsätze	n. z.
Sonstiges	Proteinase K muss auf Platz A (Position 1 und/oder 2) gesetzt werden.

n. z. = nicht zutreffend

Vorbereitung der Proteinase K in der Schublade „Sample“

Der QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit enthält eine gebrauchsfertige Proteinase-K-Lösung, die bei Raumtemperatur gelagert werden kann.

Hinweis: Röhrchen, die Proteinase K enthalten, werden in einen Röhrchenträger gesetzt. Die Röhrchen mit Proteinase K müssen in Position 1 und/oder 2 auf Platz A der Schublade „Sample“ gesetzt werden. Den erforderlichen Röhrchentyp können Sie der Labormaterialliste entnehmen, die unter dem Reiter „Resources“ auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar ist.

Anzahl Proben*	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†

* Je Probe sind bei circDNA_2000_DSP 110 µl und bei circDNA_4000_DSP 220 µl sowie ein zusätzliches Totvolumen von 1100 µl erforderlich [(n x 110 oder 220 µl) + 1100 µl].

† Bei circDNA_4000_DSP: Wenn mehr als 48 Proben verarbeitet werden, verwenden Sie ein zweites Röhrchen. Das maximale Füllvolumen je Röhrchen beträgt 11,660 µl. Beim zweiten Röhrchen ist ein zusätzliches Totvolumen von 1100 µl erforderlich.

Schublade „Reagents and Consumables“ (Reagenzien und Verbrauchsartikel)

Position A1 und/oder A2	Reagenzienkartusche
Position B1	n. z.
Halter für Spitzenracks, Positionen 1–18	Einmal-Filterspitzen, 200 µl oder 1500 µl
Halter für Verbrauchsartikel-Container, Positionen 1–4	Verbrauchsartikel-Container enthalten Probenverarbeitungseinsätze oder 8-Magnetstab-Schutzhülsen.

n. z. = nicht zutreffend

Schublade „Waste“ (Abfall)

Halter für Verbrauchsartikel-Container, Positionen 1–4	Leere Verbrauchsartikel-Container
Halter für Abfallbeutel	Abfallbeutel
Halter für Flüssigabfallbehälter	Leerer Flüssigabfallbehälter

Schublade „Eluate“ (Eluat)

Elutionsrack (Es wird empfohlen Platz 1, Kühlposition, zu verwenden.)

Weitere Informationen hierzu können Sie der Labormaterielliste entnehmen, die unter dem Reiter „Resources“ auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar ist.

Erforderliche Kunststoff-Verbrauchsartikel

Protokoll circDNA_2000_DSP

Kunststoff-Verbrauchsartikel	Eine Charge, 24 Proben*	Zwei Chargen, 48 Proben*	Vier Chargen, 96 Proben*
Einmal-Filterspitzen, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Einmal-Filterspitzen, 1500 µl ^{†‡}	64	120	232
Probenverarbeitungseinsätze [§]	15	30	60
8-Magnetstab-Schutzhülsen [¶]	3	6	12

* Bei Verwendung von weniger als 24 Proben je Charge verringert sich die Anzahl der pro Lauf benötigten Einmal-Filterspitzen.

[†] Jedes Filterspitzen-Rack enthält 32 Filterspitzen.

[‡] Bei der Anzahl der erforderlichen Filterspitzen sind die für 1 Inventar-Scan pro Reagenzienkartusche benötigten Filterspitzen eingerechnet.

[§] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält 28 Probenverarbeitungseinsätze.

[¶] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält zwölf 8-Magnetstab-Schutzhülsen.

Protokoll circDNA_4000_DSP

Kunststoff-Verbrauchsartikel	Eine Charge, 24 Proben*	Zwei Chargen, 48 Proben*	Vier Chargen, 96 Proben*
Einmal-Filterspitzen, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Einmal-Filterspitzen, 1500 µl ^{†‡}	104	200	392
Probenverarbeitungseinsätze [§]	18	36	72
8-Magnetstab-Schutzhülsen [¶]	3	6	12

* Bei Verwendung von weniger als 24 Proben je Charge verringert sich die Anzahl der pro Lauf benötigten Einmal-Filterspitzen.

[†] Jedes Filterspitzen-Rack enthält 32 Filterspitzen.

[‡] Bei der Anzahl der erforderlichen Filterspitzen sind die für 1 Inventar-Scan pro Reagenzienkartusche benötigten Filterspitzen eingerechnet.

[§] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält 28 Probenverarbeitungseinsätze.

[¶] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält zwölf 8-Magnetstab-Schutzhülsen.

Hinweis: Die angegebene Anzahl von Filterspitzen kann je nach Einstellung von der auf dem Touchscreen angezeigten Anzahl abweichen. Es wird empfohlen, die höchstmögliche Anzahl von Spitzen zu laden.

Elutionsvolumen

Ausgewähltes Elutionsvolumen	Anfängliches Elutionsvolumen
60 µl	75 µl

Das Elutionsvolumen wird auf dem Touchscreen ausgewählt. Das mittlere verfügbare Elutionsvolumen ist ≥ 60 µl. Im Einzelfall kann das endgültige Eluatvolumen bei Einzelproben bis zu 5 µl unter dem ausgewählten Volumen liegen (z. B. 55 µl). Bei Verwendung eines automatischen Assay-Systems, welches das Eluatvolumen vor dem Transfer nicht prüft, wird empfohlen, das tatsächliche Eluatvolumen zu kontrollieren.

Lagerung von Eluaten

Es wird empfohlen, die Eluatplatte unmittelbar nach Abschluss des Laufs aus der Schublade „Eluate“ zu nehmen. Elutionsplatten können nach Abschluss eines Laufs über Nacht im QIASymphony SP verbleiben (maximal 16 Stunden einschließlich Laufzeit; empfohlene Umgebungsbedingungen:

18–26 °C bei 20–75 % relativer Luftfeuchtigkeit). Je nach Temperatur und Luftfeuchtigkeit kann es im Eluat zu Kondensation oder Verdunstung kommen.

Die Eluate können nach der Probenverarbeitung bei 2–8 °C maximal 1 Monat gelagert werden. Für eine längerfristige Lagerung können die Eluate bei –20 °C bis –80 °C eingefroren werden. Gefrorene Eluate dürfen maximal 3-mal aufgetaut werden.

Vorbereitung des Probenmaterials

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Einmal-Laborhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDS) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Wichtige Hinweise vor Beginn

- Vermeiden Sie Schaumbildung in und auf den Proben.
- Die Proben müssen vor Start des Protokolllaufs auf Raumtemperatur (15–25 °C) äquilibriert werden.

Humanplasma

Zur Plasmagewinnung können mit EDTA oder Citrat als Antikoagulans behandelte Blutproben verwendet werden. Plasma aus ccfDNA-stabilisierten Blutentnahmeröhrchen kann ebenfalls verwendet werden. Das Plasma wird wie vom Hersteller angegebenen gewonnen.

Bei Verwendung von EDTA oder Citrat als Antikoagulans wird empfohlen, die Plasmatrennung unmittelbar nach der Blutentnahme durchzuführen.

Bei bestimmten nachgelagerten Anwendungen kann es erforderlich sein, Nukleinsäuren aus Vesikeln auszuschließen oder zu minimieren. In solchen Fällen wird empfohlen, das gewonnene Plasma bei Raumtemperatur (15–25 °C) 10 Minuten lang mit 16.000 x *g* zu zentrifugieren.

Nach Gewinnung und Zentrifugation kann das Plasma bei Raumtemperatur bis zu 7 Tage oder bei 2–8 °C bis zu 14 Tage gelagert werden. Zur längerfristigen Lagerung wird Einfrieren von Aliquots bei –20 °C oder –80 °C empfohlen. Gefrorenes Plasma darf maximal 3-mal aufgetaut werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen führt zur Denaturierung und Ausfällung von Proteinen, wodurch sich die Ausbeute an zirkulierenden zellfreien Nukleinsäuren verringern kann. Wenn in den Proben Kryoniederschläge sichtbar sind, zentrifugieren Sie die Proben bei Raumtemperatur (15–25 °C) 3 Minuten lang mit 6.800 x *g* und transferieren Sie den Überstand, ohne die Pellets zu stören, in ein Sekundärprobenröhrchen (siehe Labormaterialliste, die unter dem Reiter „Resources“ auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar ist). Starten Sie den Aufreinigungsvorgang sofort.

Humanurin

Aufgrund des schnellen Abbaus zirkulierender zellfreier DNA nach der Urinentnahme wird dringend empfohlen, Urinproben sofort zu stabilisieren.

Humanurin, stabilisiert

Stabilisierter Urin kann bei Raumtemperatur (15–25 °C) oder bei 2–8 °C bis zu 7 Tage gelagert werden. Zur längerfristigen Lagerung wird Einfrieren von Aliquots bei –20 °C oder –80 °C empfohlen.

Stabilisierte Urinproben erfordern keine Vorbehandlung. Nach der Stabilisierung wird empfohlen, die Urinproben bei Raumtemperatur (15–25 °C) 10 Minuten lang mit geringer Drehzahl (1900 x g) zu zentrifugieren, um vorhandene Zellen vor der Extraktion der zellfreien DNA zu entfernen. Wenn nach dem Zentrifugieren Niederschläge im Überstand sichtbar sind, erwärmen Sie die Proben im Wasserbad auf 25 °C, um die Niederschläge aufzulösen. Transferieren Sie stabilisierte Urinproben vor dem Start des Laufs in ein Sekundärprobenröhrchen und laden Sie dieses auf den Probenträger (siehe Labormaterialliste, die unter dem Reiter „Resources“ auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar ist).

Humanurin, unstabilisiert

Bevor Sie ein Protokoll starten, bei dem Buffer ATL verwendet wird, überprüfen Sie, ob sich darin ein Niederschlag gebildet hat. Lösen Sie ggf. den Niederschlag durch Erwärmen auf 70 °C im Wasserbad unter leichtem Schütteln auf. Saugen Sie Blasen an der Oberfläche des Buffer ATL ab.

Hinweis: Der ATL-Puffer (Buffer ATL, 4 x 50 ml, Kat.-Nr. 939016) ist nicht Bestandteil des QIASymphony DSP Circulating DNA Kits und muss separat bestellt werden.

Es wird empfohlen, die Urinproben sofort nach der Entnahme bei Raumtemperatur (15–25 °C) 10 Minuten lang mit geringer Drehzahl (1900 x g) zu zentrifugieren, um vorhandene Zellen zu entfernen. Unstabilisierte Urinproben erfordern eine Vorbehandlung.

Wichtig: Äquilibrieren Sie die Proben vor Beginn der Vorbehandlung auf Raumtemperatur (15–25 °C).

Wichtig: Zentrifugation und Vorbehandlung müssen innerhalb von 4 Stunden nach der Entnahme der Urinprobe durchgeführt werden.

- Mischen Sie 2500 µl (circDNA_2000_DSP) oder 4500 µl (circDNA_4000_DSP) Urin mit 250 µl bzw. 450 µl Buffer ATL.
- Inkubieren Sie die Proben 1 Stunde lang bei Raumtemperatur (15–25 °C).

- Zentrifugieren Sie die Proben bei Raumtemperatur (15–25 °C) 10 Minuten lang bei 1900 x g. Wenn nach dem Zentrifugieren Niederschläge im Überstand sichtbar sind, erwärmen Sie die Proben im Wasserbad auf 25 °C, um die Niederschläge aufzulösen.
- Transferieren die Überstände in ein Sekundärprobenröhrchen und laden Sie dieses auf den Probenträger (siehe Labormaterialliste, die unter dem Reiter „Resources“ auf der Produktseite unter www.qiagen.com verfügbar ist).

Wichtig: Die Stabilität und Integrität von zirkulierender zellfreier DNA in unstabilisierten Urinproben ist begrenzt. Es wird empfohlen, je QIAasympphony Lauf maximal eine Charge mit 24 Proben zu laden, um den Zeitraum zu minimieren, für den sich die Urinproben im Gerät befinden.

Störsubstanzen

Hohe Konzentrationen von Gammaglobulin (> 30 g/l) in Plasmaproben können zur einer geringeren Ausbeute an zirkulierender zellfreier DNA führen.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch des jeweiligen QIAGEN Kits. Handbücher und Gebrauchsanweisungen zu QIAGEN Kits finden Sie im Internet unter www.qiagen.com oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder bei Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAasympphony® (QIAGEN Gruppe). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt.
02/2017 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

