

Februari 2017

Protocolblad QIASymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V1 en
circDNA_4000_DSP_V1

Dit document is het protocolblad voor QIASymphony circDNA_2000_DSP_V1 en
circDNA_4000_DSP_V1, versie 1, R1

Algemene informatie

Voor in-vitrodiagnostiek.

Dit protocol is bedoeld voor de opzuivering van humaan circulerend celvrij DNA uit verse of bevroren humane plasma en urine met behulp van de QIASymphony SP en de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit.

Kit	QIASymphony DSP Circulating DNA Kit (cat. nr. 937556)
Monstermateriaal	Humaan plasma: met antistollingsmiddel EDTA of citraat, of met gestabiliseerd ccfDNA Humane urine: niet-gestabiliseerd of gestabiliseerd
Naam protocol	circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1
Standaard assaycontroleaset	ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1
Elutievolume	60 µl
Vereiste softwareversie	Versie 4.0.3 of hoger

De lade "Sample" (Monsterlade)

Monstertype	Humaan plasma (zie "Preparation of sample material") en Humane urine (gestabiliseerd of niet-gestabiliseerd)
Monstervolume	Afhankelijk van het gebruikte type monsterbuis Zie voor meer informatie de lijst met laboratoriummaterialen (labware) die te vinden is onder het tabblad "Resources" van de productpagina op www.qiagen.com .
Primaire monsterbuizen	n.v.t.
Secondaire monsterbuizen	Zie voor meer informatie de lijst met laboratoriummaterialen (labware) die te vinden is onder het tabblad "Resources" van de productpagina op www.qiagen.com .
Inzetten	n.v.t.
Overige	Proteïnase K moet in slot A (positie 1 en/of 2) worden toegevoegd

n.v.t. = niet van toepassing.

Vorbereitung van proteïnase K in de lade "Sample"

De QIAasymphony DSP Circulating DNA-kit bevat gebruiksklare proteïnase K-oplossing die bij kamertemperatuur kan worden bewaard.

Opmerking: Buizen met proteïnase K worden in een buizendrager geplaatst. De buis / buizen met proteïnase K moet(en) op positie 1 en/of 2 in slot A van de lade "Sample" worden geplaatst. Zie voor het vereiste type buizen de lijst met laboratoriummaterialen (labware) die te vinden is onder het tabblad "Resources" van de productpagina op www.qiagen.com.

Aantal monsters*	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†

* Voor elk monster is 110 µl voor circDNA_2000_DSP of 220 µl voor circDNA_4000_DSP nodig, plus een extra dood volume van 1100 µl [(n x 110 of 220 µl) + 1100 µl].

† Voor circDNA_4000_DSP: Als er meer dan 48 monsters worden verwerkt, gebruik dan een tweede buis. Het maximale laadvolume per buis is 11,660 µl. Voor de tweede buis is een extra dood volume van 1100 µl nodig.

De lade "Reagents and Consumables" (Reagentia- en verbruiksartikelenlade)

Positie A1 en/of A2	Reagenscartridge
Positie B1	n.v.t.
Tiprekhouder 1-18	Disposable filtertips, 200 µl of 1500 µl
Verpakkingsdooshouder 1-4	Verpakkingsdozen met monsterbereidingscartridges of 8-staafhulzen

n.v.t. = niet van toepassing.

De lade "Waste" (Afvallade)

Verpakkingsdooshouder 1-4	Lege verpakkingsdozen
Afvalzakhouder	Afvalzak
Houder afvalvloeistoffenfles	Lege afvalvloeistoffenfles

De lade "Eluate" (Eluaatlade)

Elutierek (het wordt aangeraden om slot 1, de koelpositie, te gebruiken)

Zie voor meer informatie de lijst met laboratoriummaterialen (labware) die te vinden is onder het tabblad "Resources" van de productpagina op www.qiagen.com.

Benodigde plastic artikelen

Protocol circDNA_2000_DSP

Plastic artikelen	Eén batch 24 monsters*	Twee batches 48 monsters*	Vier batches 96 monsters*
Disposable filtertips, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Disposable filtertips, 1500 µl ^{†‡}	64	120	232
Monsterbereidingscartridges [§]	15	30	60
8-staafhulzen [¶]	3	6	12

* Bij gebruik van minder dan 24 monsters per batch zijn minder disposable filtertips per run nodig.

[†] Er zitten 32 filtertips in een filtertiprek.

[‡] Het aantal benodigde filtertips is inclusief tips voor 1 voorraadscan per reagenscartridge.

[§] Er zitten 28 monsterbereidingscartridges in een verpakingsdoos.

[¶] Er zitten twaalf 8-staafhulzen in een verpakingsdoos.

Protocol circDNA_4000_DSP

Plastic artikelen	Eén batch 24 monsters*	Twee batches 48 monsters*	Vier batches 96 monsters*
Disposable filtertips, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Disposable filtertips, 1500 µl ^{†‡}	104	200	392
Monsterbereidingscartridges [§]	18	36	72
8-staafhulzen [¶]	3	6	12

* Bij gebruik van minder dan 24 monsters per batch zijn minder disposable filtertips per run nodig.

[†] Er zitten 32 filtertips in een filtertiprek.

[‡] Het aantal benodigde filtertips is inclusief tips voor 1 voorraadscan per reagenscartridge.

[§] Er zitten 28 monsterbereidingscartridges in een verpakingsdoos.

[¶] Er zitten twaalf 8-staafhulzen in een verpakingsdoos.

Opmerking: De gegeven aantallen filtertips kunnen afwijken van de aantallen die op het aanraakscherm worden weergegeven. Dit is afhankelijk van de instellingen. Het wordt aangeraden om het maximaal mogelijke aantal tips te plaatsen.

Elutievolume

Geselecteerd elutievolume	Initieel elutievolume
60 µl	75 µl

Het elutievolume wordt op het aanraakscherm geselecteerd. Het gemiddelde beschikbare elutievolume is ≥ 60 µl. In individuele gevallen kan het uiteindelijke eluaatvolume voor enkelvoudige monsters tot 5 µl kleiner zijn dan het geselecteerde volume (bijv. 55 µl). Bij gebruik van een geautomatiseerd assay-setupsysteem dat het eluaatvolume niet controleert voordat het eluaat wordt overgebracht, wordt aangeraden om het werkelijke eluaatvolume te controleren.

Bewaring van eluaten

Het wordt aangeraden om de elutieplaat direct na afloop van de run uit de lade "Eluate" te nemen. Elutieplaten kunnen na afloop van de run overnacht in de QIA Symphony SP blijven staan (maximaal 16 uur inclusief runtijd; aanbevolen omgevingscondities:

18–26 °C en 20–75% relatieve vochtigheid). Afhankelijk van de temperatuur en luchtvochtigheid kunnen eluaten condensatie of verdamping ondergaan.

Na de monsterbereiding kunnen de eluaten maximaal 1 maand bij 2–8 °C worden bewaard. Voor langdurige bewaring kunnen eluaten worden bewaard bij –20 °C of bij –80 °C. Bevroren eluaten mogen niet vaker dan 3 maal worden ontdooid.

Bereiding van monstermateriaal

Draag wanneer u met chemicaliën werkt altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB of SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Belangrijke punten voordat u begint

- Zorg dat er geen schuim wordt gevormd in of op de monsters.
- Monsters moeten vóór het starten van de run op kamertemperatuur (15–25 °C) worden gebracht.

Humaan plasma

Bloedmonsters die met EDTA of citraat als antistollingsmiddel zijn behandeld, kunnen worden gebruikt voor de bereiding van plasma. Plasma dat is bereid uit bloedafnamebuizen met gestabiliseerd ccfDNA kunnen ook worden gebruikt. Plasma wordt gegenereerd volgens de specificaties van de fabrikant.

Het wordt aangeraden om de plasmascheiding onmiddellijk naar de bloedafname uit te voeren, wanneer EDTA of citraat als antistollingsmiddel wordt gebruikt.

Voor bepaalde downstream toepassingen kan het nodig zijn om nucleïnezuren uit blaasjes te verwijderen of te minimaliseren. In zulke gevallen wordt aangeraden om na de initiële plasmabereiding een high-speed centrifugatiestap uit te voeren bij 16.000 x g, gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Na monsterafname en centrifugering kan het plasma maximaal 7 dagen bij kamertemperatuur, en maximaal 14 dagen bij 2-8 °C worden bewaard. Voor langdurige bewaring wordt aangeraden om aliquots in te vriezen bij –20 °C of bij –80 °C. Bevroren plasma mag niet vaker dan 3 maal worden ontdooid. Herhaald invriezen en ontdooien leidt tot denaturatie en precipitatie van eiwitten, hetgeen mogelijk resulteert in verminderde opbrengsten van circulerende celvrije nucleïnezuren. Als er cryoprecipitaat in de monsters zichtbaar is, centrifugeer dan gedurende 3 minuten bij 6.800 x g bij kamertemperatuur (15–25 °C) en breng de supernatanten, zonder de pellets te verstoren, over na een secundaire monsterbuis (zie de lijst met laboratoriummaterialen [labware] die te vinden is onder het tabblad “Resources” van de productpagina op www.qiagen.com). Start onmiddellijk met de opzuiveringsprocedure.

Humane urine

Vanwege de snelle afbraak van circulerend celvrij DNA na urineafname, wordt sterk aangeraden om urinemonsters onmiddellijk te stabiliseren.

Gestabiliseerde humane urine

Gestabiliseerde urine kan maximaal 7 dagen bij kamertemperatuur (15–25 °C) of bij 2-8 °C worden bewaard. Voor langdurige bewaring wordt aangeraden om aliquots in te vriezen bij –20 °C of bij –80 °C.

Gestabiliseerde urinemonsters hoeven niet te worden voorbehandeld. Het wordt aangeraden om urinemonsters na stabilisatie gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C) te centrifugeren bij lage snelheid (1900 x g), om voorafgaand aan de extractie van circulerend celvrij

DNA cellen te verwijderen. Als er na het centrifugeren precipitaat zichtbaar is in het supernatant, verwarm de monsters dan in een waterbad tot 25 °C om de precipitaten op te lossen. Breng vóór het starten van een run gestabiliseerde urinemonsters over naar een secundaire monsterbuis, en plaatst deze buis vervolgens in de monsterdrager (zie de lijst met laboratoriummaterialen [labware] die te vinden is onder het tabblad "Resources" van de productpagina op www.qiagen.com).

Humane urine "non-stabilized" (niet-gestabiliseerd)

Controleer voordat u een protocol start waarbij ATL-buffer moet worden gebruikt, of er in die buffer geen precipitaat is gevormd. Los het precipitaat indien nodig op door de buffer onder voorzichtig schudden te verwarmen in een waterbad op 70 °C. Zuig luchtbellens van het oppervlak van de ATL-buffer op.

Opmerking: ATL-buffer (Buffer ATL, 4 x 50 ml, cat. nr. 939016) maakt geen deel uit van de QIASymphony DSP Circulating DNA-kit en moet afzonderlijk worden besteld.

Het wordt aangeraden om urinemonsters onmiddellijk na afname gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C) te centrifugeren bij lage snelheid (1900 x g), om cellen te verwijderen. Niet-gestabiliseerde urinemonsters moeten worden voorbehandeld.

Belangrijk: Monsters moeten vóór het starten van de voorbehandeling op kamertemperatuur (15–25 °C) worden gebracht.

Belangrijk: Het centrifugeren en de voorbehandeling moeten binnen 4 uur na het afnemen van het urinemonster worden uitgevoerd.

- Meng 2500 µl urine (circDNA_2000_DSP) of 4500 µl urine (circDNA_4000_DSP) met respectievelijk 250 µl of 450 µl ATL-buffer.
- Incubeer de monsters gedurende 1 uur bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Centrifugeer de monsters gedurende 10 minuten bij 1900 x g bij kamertemperatuur (15–25 °C).

Als er na het centrifugeren precipitaat zichtbaar is in het supernatant, verwarm de monsters dan in een waterbad tot 25 °C om de precipitaten op te lossen.

- Breng het supernatant over naar een secundaire monsterbuis, en plaatst deze buis vervolgens in de monsterdrager (zie de lijst met laboratoriummaterialen [labware] die te vinden is onder het tabblad "Resources" van de productpagina op www.qiagen.com).

Belangrijk: De stabiliteit en integriteit van circulerend celvrij DNA in niet-gestabiliseerde urine is beperkt. Het wordt aangeraden om maximaal één batch met 24 monsters per QIASymphony-run te laden, om de tijd dat de urinemonsters in het apparaat staan zo kort mogelijk te houden.

Verstorende stoffen

Plasmamonsters met hoge concentraties gammaglobuline (> 30 g/l) kunnen een verminderde opbrengst van circulerend celvrij DNA opleveren.

Raadpleeg voor bijgewerkte licentie-informatie en productspecifieke disclaimers het desbetreffende handboek van de QIAGEN-kit of de gebruikershandleiding. Handboeken van QIAGEN-kits en gebruikershandleidingen zijn beschikbaar op www.qiagen.com of kunnen worden opgevraagd bij de afdeling QIAGEN Technical Services of uw lokale QIAGEN-vestiging.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Gedeponeerde namen, handelsmerken, enz. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet als niet wettelijk beschermd worden beschouwd.
02/2017 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

