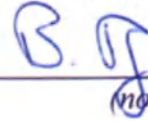


7В  
**КОПИЯ**

«УТВЕРЖДАЮ» / “APPROVE”  
QIAGEN GmbH

Управляющий директор /Managing Director  
(должность/position)

Бартхолд Пиэнинг / Barthold Piening  
(имя/name)



(подпись/signature)

М.П. / Stamp  
QIAGEN GmbH  
QIAGEN Straße 1  
40724 Hilden  
Germany

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов

# Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Версия 1

IVD

Для диагностики in vitro

CE

REF 60404



QIAGEN GmbH  
(КАЙДЖЕН ГмбХ)

Qiagen Str. 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)

R3 MAT 10062689EN



Deed Roll No. 1749 / 2021 M

I hereby certify that signature on the document affixed and sealed hereto was authenticated before me by

Mr. Dr. Barthold Piening, born on 19. November 1958,  
business address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden,  
who is personally known to me.

Mr. Dr. Barthold Piening not acting in own matter, but on behalf of

**QIAGEN GmbH**

(Address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden).

Upon my inspection to the electronic Commercial register of Düsseldorf under HR B 45822 I hereby certify that:

- there the Company QIAGEN GmbH with headquarters in Hilden is listed;
- there Mr. Dr. Barthold Piening as Managing Director is registered and always empowered to represent the Company solely in each matter;
- Mr. Dr. Barthold Piening is always relieved from the restrictions on self-contracting according to § 181 of the German Civil Code ("BGB").

I could not inform myself about the content of the certified document because I do not master the language of the document. The notarization does not refer to the correctness of the document.

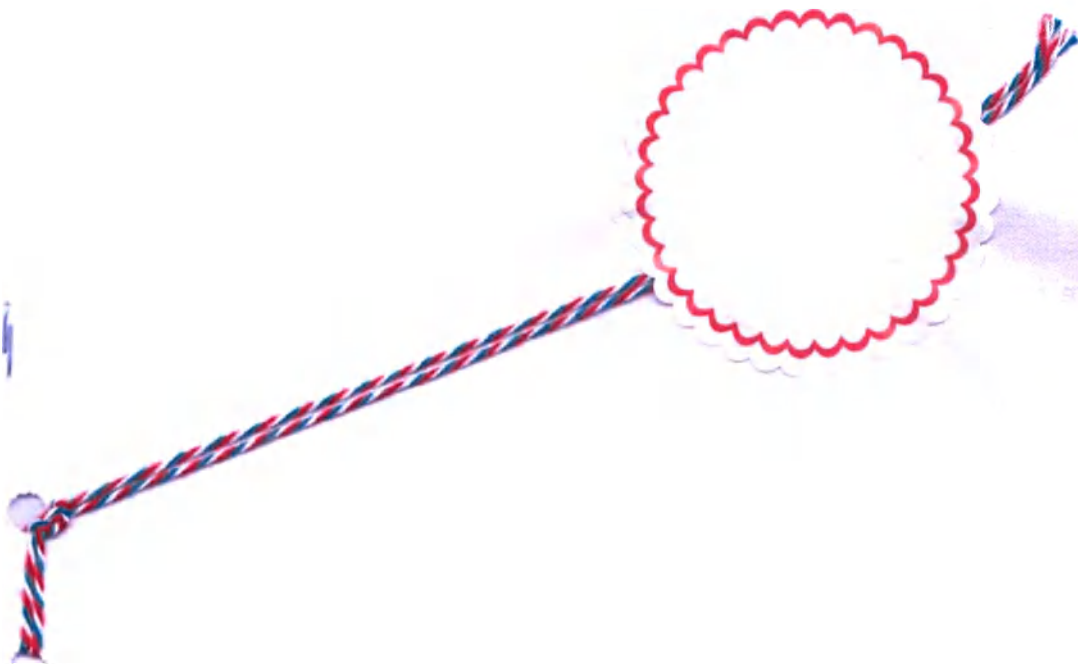
Hilden, 11 August 2021



Dr. Niklas Mairose

Notary public

Mittelstraße 36-38, 40721 Hilden, Germany



## Оглавление

|                                                                                                  |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Наименование изделия.....                                                                     | 5  |
| 2. Производитель .....                                                                           | 5  |
| 3. Назначение, показания к применению, противопоказания.....                                     | 5  |
| 4. Сведения о потенциальных потребителях .....                                                   | 5  |
| 5. Общие сведения.....                                                                           | 6  |
| 6. Принцип действия .....                                                                        | 6  |
| 7. Комплектность набора .....                                                                    | 7  |
| 8. Необходимые материалы, не входящие в комплект набора .....                                    | 8  |
| 9. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения..... | 8  |
| 10. Предупреждения и меры предосторожности.....                                                  | 8  |
| 11. Срок годности. ....                                                                          | 10 |
| 12. Хранение и перемещение реагентов .....                                                       | 10 |
| 13. Хранение и перемещение образцов .....                                                        | 11 |
| 14. Процедура.....                                                                               | 11 |
| 14.1. Протокол: Выделение геномной ДНК из срезов FFPE-блоков.....                                | 14 |
| 15. Контроль качества .....                                                                      | 15 |
| 16. Эксплуатационные характеристики.....                                                         | 15 |
| 16.1. Повторяемость .....                                                                        | 15 |
| 16.2. Воспроизводимость.....                                                                     | 16 |
| 16.3. Перекрестное загрязнение .....                                                             | 19 |
| 16.4. Интерферирующие вещества .....                                                             | 20 |
| 16.5. Чувствительность, специфичность и точность.....                                            | 20 |
| 16.6. Выход ДНК .....                                                                            | 20 |
| 17. Маркировка .....                                                                             | 20 |
| 18. Требование к охране окружающей среды. ....                                                   | 21 |
| 19. Утилизация .....                                                                             | 21 |
| 20. Контактная информация .....                                                                  | 22 |
| 21. Гарантийные обязательства .....                                                              | 22 |
| 22. Рекламации .....                                                                             | 22 |
| 23. Редакция документа.....                                                                      | 22 |



## **КАЙДЖЕН, Технологии для отбора образцов и проведения анализов**

Компания QIAGEN — ведущий поставщик инновационных технологий отбора и анализа проб, позволяющих выделять и распознавать компоненты любых биологических образцов. Наши высокотехнологичные продукты и услуги отличаются высоким качеством и обеспечивают успех на всех этапах работы, от взятия образца до получения результата анализа.

QIAGEN задает стандарты в таких областях, как:

- Очистка ДНК, РНК и белков
- Анализ нуклеиновых кислот и белков
- Исследование микро-РНК и РНК-интерференции
- Автоматизация технологических процессов отбора и анализа проб

Наша миссия заключается в том, чтобы помогать вам добиваться выдающихся успехов и совершать прорывы. Более подробную информацию см. на веб-сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## 1. Наименование изделия

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения:  
Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit:

1. Колонки QIAamp MinElute с промывочными пробирками (50 шт.).
2. Промывочные пробирки (2 мл) WT (3 x 50 шт.).
3. Пробирки для элюирования (1,5 мл) ET (50 шт.).
4. Пробирки для лизиса (2 мл) LT (50 шт.).
5. Буфер для лизиса тканей (10 мл) ATL (1 шт.).
6. Буфер для лизиса (12 мл) AL (1 шт.).
7. Промывочный буфер 1 (концентрат) (19 мл) AW1 (1 шт.).
8. Промывочный буфер 2 (концентрат) (13 мл) AW2 (1 шт.).
9. Элюирующий буфер (12 мл) ATE (1 шт.).
10. Протеиназа К (1,25 мл) PK (1 шт.).
11. Инструкция по применению.

## 2. Производитель

QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ)  
Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)  
Номер телефона: +49-02103-29-0  
Адрес электронной почты: [info@qiagen.com](mailto:info@qiagen.com);  
Сайт: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

## 3. Назначение, показания к применению, противопоказания.

### Назначение

Для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов методом селективного связывания на мембране из диоксида кремния.

### Описание

Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (далее набор реагентов, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit) представляет собой систему, использующую технологию селективного связывания ДНК на мембране из диоксида кремния (QIAamp технология) для выделения и очистки ДНК из образцов фиксированных в формалине и залитых парафином блоков ткани (FFPE-блоков).

Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit - это готовое к использованию медицинское изделие для выделения и очистки ДНК из образцов FFPE-блоков тканей.

Набор рассчитан на обработку 50 образцов.

Время полного цикла анализа с использованием набора не превышает 90 минут.

### Показания к применению

Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit предназначен для выделения ДНК в качестве этапа пробоподготовки для последующего анализа очищенных нуклеиновых кислот в клинической лабораторной диагностике, в частности методом ПЦР.

Является преаналитическим методом, набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit предназначен для подготовки образцов, но не для получения результатов исследований, качественных или количественных.

### Противопоказания к применению

При использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

## 4. Сведения о потенциальных потребителях

Набор должен использоваться только квалифицированным персоналом (лаборантами или врачами клинической лабораторной диагностики, владеющими методами молекулярно-биологических исследований для диагностики in vitro) в условиях профессиональной клинικο-



диагностической лаборатории. Пользователь также должен иметь навыки, необходимые для правильного выполнения исследований, описанных в данной инструкции по применению.

Медицинское изделие предназначено только для профессионального использования. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

## 5. Общие сведения

В наборе QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit используется проверенная технология QIAamp DNA для выделения и очистки геномной ДНК из небольших объемов или размеров образца. В наборе используется сочетание селективных связывающих способностей мембран на основе диоксида кремния и вариативность объемов элюирования.

Условия лизиса позволяют эффективно очищать геномную ДНК из срезов FFPE-блоков без необходимости дополнительной инкубации. Инкубация при повышенных температурах после воздействия протеиназы К частично удаляет перекрестное связывание высвобождаемой ДНК с формалином, потенциально улучшая выход ДНК. Следует обратить внимание, что ДНК, выделенная из FFPE-блоков, обычно имеет более низкую молекулярную массу, чем ДНК из свежих или замороженных образцов ткани. Степень фрагментации зависит от типа и свежести образца и условий, используемых для фиксации.

После лизиса образца, процедура QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit пригодная для большинства операций.

## 6. Принцип действия

Процедура выделения ДНК с использованием набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit состоит из шести этапов (Рисунок 1):

- Удаление парафина: Парафин растворяется в ксилоле и выводится
- Лизис: Образец проходит лизис при температуре 56°C в присутствии протеиназы К
- Нагрев: Инкубация при 90°C разрушает перекрестное связывание с формалином
- Связывание: ДНК связывается с мембраной, а посторонние вещества проходят через нее
- Промывка: Вымываются остаточные вещества
- Элюирование: Чистая, концентрированная ДНК вымывается с мембраны

### Процедура выделения ДНК с использованием QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Образец



Удаление парафина

Лизис

Нагревание

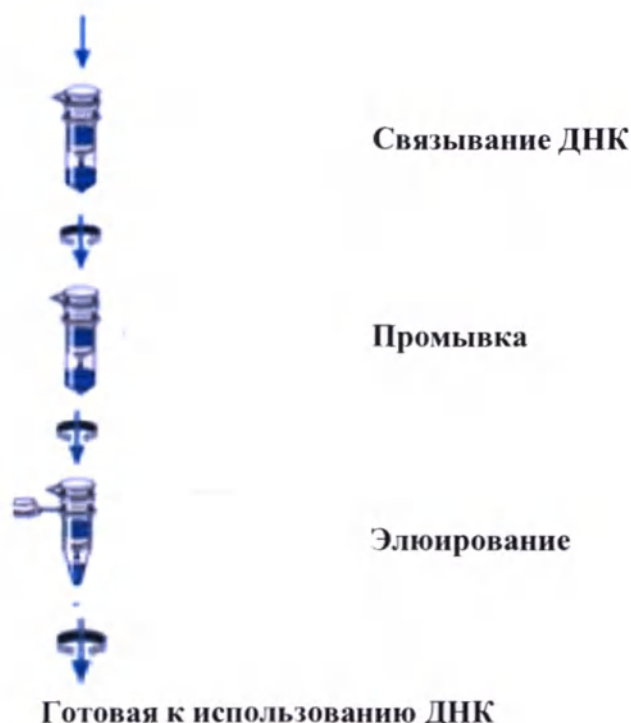


Рисунок 1. Процедура QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

## 7. Комплектность набора

### Состав набора

| Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit |                                                   |                        |            |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------|------------|
| Каталожный номер                     |                                                   |                        | 60404      |
| Количество реакций                   |                                                   |                        | 50         |
| Обозначение                          | Описание                                          | Идентификация          | Количество |
| QIAamp MinElute                      | Колонки QIAamp MinElute с промывочными пробирками | <b>COL</b>             | 50 шт      |
| WT                                   | Промывочные пробирки (2мл)                        | <b>WASH TUBE</b>       | 3 x 50 шт  |
| ET                                   | Пробирки для элюирования (1,5мл)                  | <b>ELU TUBE</b>        | 50 шт      |
| LT                                   | Пробирки для лизиса (2мл)                         | <b>LYS TUBE</b>        | 50 шт      |
| ATL                                  | Буфер для лизиса тканей (10мл)                    | <b>TIS LYS BUF</b>     | 1 шт       |
| AL                                   | Буфер для лизиса (12 мл)                          | <b>LYS BUF</b>         | 1 шт       |
| AW1                                  | Промывочный буфер 1* (концентрат) (19мл)          | <b>WASH BUF 1 CONC</b> | 1 шт       |
| AW2                                  | Промывочный буфер 2** (концентрат) (13 мл)        | <b>WASH BUF 2 CONC</b> | 1 шт       |
| ATE                                  | Элюирующий буфер ** (12мл)                        | <b>ELU BUF</b>         | 1 шт       |
| PK                                   | Протеиназа К (1,25мл)                             | <b>PROTK</b>           | 1 шт       |
| Инструкция по применению             |                                                   |                        | 1 шт       |

\* содержит гуанидина гидрохлорид.

\*\* содержит азид натрия в качестве консерванта



*Примечание: При работе с химикатами всегда надевайте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта или в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).*

## 8. Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- Ксилол
- Этанол (96-100%)\*
- Пипетки (регулируемые) и наконечники для пипеток (во избежание перекрестного загрязнения рекомендуются наконечники для пипеток с аэрозольными барьерными фильтрами)
- Термомиксер или нагревательный блок\*\* для лизиса образцов при 56°C, 70°C и 90°C
- Микроцентрифуга\*\* (с ротором на 2 мл пробирки)
- Вортекс
- Для образцов менее 200 мкл: 0,9% раствор NaCl

\* не используйте денатурированный этанол, который содержит примеси метанола и метилэтилкетона

\*\* убедитесь, что инструменты проверены и откалиброваны согласно рекомендациям производителя

## 9. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения

Лекарственные средства, материалы человеческого и животного происхождения: не используются.

## 10. Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*

### Правила техники безопасности

При работе с химикатами всегда используйте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки.

Для получения дополнительной информации ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности (SDS). Эти паспорта можно получить в компактном и удобном формате PDF на сайте [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), где можно найти, распечатать SDS каждого набора компании QIAGEN и каждого компонента в наборе. Утилизацию образцов и отходов после анализа следует проводить в соответствии с местными нормами безопасности.

### Общие меры предосторожности

Следует всегда обращать внимание на следующее:

- Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.
- Анализ следует проводить с образцами срезов фиксированных в формалине и залитых парафином блоков ткани (FFPE-блоков)
- Следует допускать к работе только обученный персонал.
- Следует использовать одноразовые перчатки без талька, халат и защитные очки. Для получения дополнительной информации по безопасности можно обратиться к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые размещены в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).
- Запрещается использовать набор или компоненты с истекшим сроком годности и/или поврежденной упаковкой компонентов набора.
- Со всеми образцами следует обращаться как с потенциально биологически опасными веществами. Утилизацию образцов и отходов на различных стадиях обработки образца следует проводить в соответствии с местными/национальными правилами утилизации через уполномоченные организации в данном регионе.



- До, вовремя и после применения этого набора, все потенциально опасные материалы (то есть материалы, которые могли войти в контакт с клиническими образцами), включая пробирки, наконечники и прочие материалы, следует обрабатывать и утилизировать в соответствии с применимыми и соответствующими муниципальными / правительственными нормами, действующими в месте применения этого продукта.
- Не следует хранить открытыми пробирки с реагентами.
- Следует использовать калиброванные пипетки и инструменты.
- Следует использовать наконечники с фильтрами для пипеток
- Все поставляемые реагенты в наборах предназначены для использования только с другими реагентами из того же набора. Не следует заменять реагенты из набора на реагенты из других наборов, в том числе аналогичных, так как это может снизить эффективность работы.

*Примечание: Набор реагентов не содержит материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным*

### Предупреждения



**ВНИМАНИЕ: не добавляйте отбеливатель или кислотные растворы непосредственно в отходы, содержащие буфер AL и буфер AW1**

Буферы AL и AW1 содержат гуанидингидрохлорид, который способен создавать высоко реакционноспособные вещества при соединении с отбеливателем.

В случае пролива жидкости, содержащей вышеперечисленные буферы, необходимо произвести очистку с использованием лабораторных детергентов и воды. Если разлитая жидкость потенциально инфицирована, сначала очистите зараженную зону лабораторным детергентом и водой, а затем 1 % раствором (объемного содержания) гипохлорита натрия.

В случае повреждения или протекания флаконов с буфером, наденьте перчатки и защитные очки во время утилизации флаконов, чтобы избежать вреда для своего здоровья и здоровья окружающих.

Компания QIAGEN не проводила испытаний жидких отходов, получаемых после выполнения процедур с использованием набора, на остаточные инфекционные материалы. Загрязнение жидких отходов остаточными инфекционными материалами маловероятно, но ее не стоит полностью исключать. Следовательно, жидкие отходы необходимо считать инфекционными, обрабатывать и утилизировать в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

К компонентам набора реагентов QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit применяются следующие коды риска и безопасности.

|                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Буфер AL</b><br>  | Содержит гуанидингидрохлорид, малеиновую кислоту.<br>Может представлять опасность при попадании в пищеварительный тракт или дыхательные пути. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Может вызывать аллергические реакции кожи. В случае раздражения глаз: обратитесь за медицинской помощью. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз и лица. |
| <b>Буфер ATL</b><br> | Внимание! Вызывает легкое раздражение кожи. При возникновении раздражения кожи: Обратитесь за врачебной консультацией / помощью                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| <b>Буфер AW1</b><br> | Содержит гуанидингидрохлорид.<br>Может представлять опасность при попадании в пищеварительный тракт или дыхательные пути. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу в случае плохого самочувствия. Утилизируйте раствор/контейнер в специализированной установ-                                                           |



|                                                                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                          | ке, предназначенной для утилизации отходов. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз и лица.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <b>Протеиназа К</b><br> | Содержит: Протеиназу К. Опасно! Вызывает легкое раздражение кожи. Может вызывать симптомы аллергии или астмы, или затрудненное дыхание при вдыхании. Не вдыхайте пыль / дым / газ / туман / пары / спрей. Утилизируйте содержимое / контейнер с помощью специализированной компании по утилизации отходов. В случае респираторных симптомов: Свяжитесь с Токсикологическим центром или врачом / терапевтом. ПРИ ВДЫХАНИИ: В случае затруднения дыхания, выведите пострадавшего(ую) на свежий воздух и обеспечьте ему(ей) покой в положении, удобном для дыхания. Пользуйтесь средствами защиты дыхания. |

## Ограничения

Эффективность набора была определена при использовании образцов фиксированных в формалине и залитых парафином блоков ткани (FFPE-блоков) для выделения ДНК.

Для достижения оптимальных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению. Не рекомендуется разбавление реагентов, отличное от описанного в данной инструкции, которое приводит к потере производительности.

Следует обратить внимание на сроки годности и условия хранения, указанные на упаковке и этикетках всех компонентов. Не используйте просроченные или неправильно хранящиеся компоненты.

Для того, чтобы минимизировать риск неправильной интерпретации результатов последующей диагностики, необходимо использовать надлежащие контроли при последующих исследованиях.

Любые полученные диагностические результаты следует толковать вместе с другими клиническими или лабораторными данными.

## 11.Срок годности.

Срок годности набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit составляет 24 месяца. Изделие стабильно до истечения срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Условия хранения реагентов: при температуре 15-25°C,

Условия хранения колонок QIAamp MinElute - при температуре 2-8°C.

Условия транспортирования: при температуре от -20 до +45°C.

Если изделие предназначено только для периодического применения, после вскрытия флаконов, реагенты можно хранить при температуре 15-25°C и колонки QIAamp MinElute при 2-8°C в течение 24 месяцев (до истечения срока годности набора). После добавления этанола (96-100%) буферы AW1 и AW2 стабильны в течение 12 месяцев.

После истечения срока годности изделие использовать запрещено.

## 12.Хранение и перемещение реагентов

Колонки QIAamp MinElute должны храниться при температуре 2–8°C после прибытия.

Все буферы могут храниться при комнатной температуре (15–25°C). Они сохраняют стабильность до истечения срока годности набора. При этом восстановленный буфер AW1 и AW2 можно хранить при комнатной температуре (15-25°C) в течение 1 года или до истечения срока годности набора, в зависимости от того, что наступит ранее.

Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit содержит готовый к использованию раствор Протеиназы К, который поставляется в специальном буфере для хранения. Протеиназа К стабильна до истечения срока годности набора при условии хранения при комнатной температуре (15-25°C).

Срок хранения Набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit после вскрытия – 24 месяца. Буферы AW1 и AW2 стабильны в течение 12 месяцев после разбавления этанолом.



### 13. Хранение и перемещение образцов

Следует использовать стандартные процедуры приготовления FFPE-блоков ткани. Для предотвращения фрагментации ДНК, обязательно:

- Зафиксируйте образцы тканей в формалине в соответствии с лабораторным протоколом (общепринятым является 10% нейтральный забуференный формалин) как можно быстрее после хирургического извлечения образца.
- Время фиксации должно составлять 14-24 часа. Ограничивайте время фиксации, так как длительная фиксация (например, более 24 часов) может приводить к сильной фрагментации ДНК, что, в свою очередь, ведет к снижению эффективности дальнейших анализов.
- Тщательно обезвоживайте образцы перед их обработкой формалином (остаточный формалин может ингибировать протеиназу К).

ДНК элюируется буфером АТЕ и уже сразу готова к использованию в реакции амплификации или для хранения (условия зависят от требований пользователя). Обычно применимые условия хранения: при температуре от +2 °C до +8 °C не более 24 часов; для хранения более 24 часов раствор ДНК рекомендуется хранить при температуре от -20 °C.

Условия хранения биопсийного материала, предназначенного для выделения ДНК:

- при комнатной температуре — в течение 6 часов;
- при температуре от +2 до +8 °C — в течение 3 суток;
- при температуре минус -20 °C — в течение 1 недели;
- при температуре минус -70 °C — длительно.

### 14. Процедура

**Важные пункты, которые необходимо учитывать перед началом процедуры**

- После получения набора проверьте компоненты набора на наличие повреждений. Если упаковки или флаконы с буфером повреждены, свяжитесь со Службой технической поддержки QIAGEN или своим региональным дистрибьютором. В случае разлива жидкости см. пункт «Предупреждения и меры предосторожности». Не используйте поврежденные компоненты набора, поскольку их применение может снижать эффективность набора.
- Всегда меняйте наконечник дозатора между переносами жидкости. Для минимизации перекрестной контаминации мы рекомендуем использовать наконечники с аэрозольным барьером.
- Все этапы центрифугирования выполняйте при комнатной температуре (15-25°C).
- Всегда используйте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте их на контаминацию материалом образца. В случае загрязнения утилизируйте перчатки.
- Для минимизации перекрестной контаминации открывайте только по одной пробирке за раз.
- Не рекомендуется использовать компоненты из других наборов, однако при необходимости, компоненты можно использовать только в том случае, если номера партий наборов идентичны.
- Не допускайте микробную контаминацию реактивов из набора.
- Для минимизации риска инфицирования потенциально инфекционным материалом мы рекомендуем работать в проточном ламинарном шкафу до тех пор, пока образцы не пройдут лизис.
- Данный набор могут использовать только сотрудники, обученные лабораторным процедурам для диагностики *in vitro*.
- Неиспользованные буферы, фильтраты и остатки образцов следует утилизировать в соответствии с местными/национальными правилами утилизации через уполномоченные организации в данном регионе.
- Если используются расходные пластиковые материалы, не входящие в комплект набора, то рекомендуется использовать одноразовые конические пробирки на 1,5-2 мл из поли-



пропилена с низкой связывающей способностью без ДНКаз/РНКаз с надежными крышками.

- Выполняйте все этапы центрифугирования при комнатной температуре (15-25°C)
- Все буферы следует хранить при комнатной температуре (15-25°C) и тщательно перемешивать перед использованием.
- Если Буфер AL или Буфер ATL содержат осадок, растворите его посредством нагревания до 70°C с легким перемешиванием.
- Убедитесь, что Буфер AW1 и Буфер AW2 были подготовлены в соответствии с представленными ниже инструкциями.

### **Приготовление буферов**

#### Приготовление Буфера ATL

Перед началом процедуры проверьте Буфер ATL на наличие сформировавшегося осадка. При необходимости растворите осадок посредством нагревания до 70°C с легким перемешиванием.

#### Приготовление Буфера AL

Перед началом процедуры проверьте Буфер AL на наличие сформировавшегося осадка. При необходимости растворите осадок посредством нагревания до 70°C с легким перемешиванием.

#### Приготовление Буфера AW1

Добавьте 25 мл этанола (96-100%) во флакон, содержащий 19 мл концентрированного Буфера AW1. На этикетке сделайте отметку о том, что этанол был добавлен. Восстановленный Буфер AW1 можно хранить при комнатной температуре (15-25°C) в течение 1 года или до истечения срока годности набора, в зависимости от того, что наступит раньше. Рекомендуется записывать дату приготовления на этикетке буфера.

*Примечание: Перед началом процедуры перемешайте восстановленный Буфер AW1 посредством встряхивания.*

#### Приготовление Буфера AW2

Добавьте 30 мл этанола (96-100%) во флакон, содержащий 13 мл концентрированного Буфера AW2. На этикетке сделайте отметку о том, что этанол был добавлен. Восстановленный буфер AW2 можно хранить при комнатной температуре (15-25°C) в течение 1 года или до истечения срока годности набора, в зависимости от того, что наступит раньше. Рекомендуется записывать дату приготовления на этикетке буфера.

*Примечание: Перед началом процедуры перемешайте восстановленный буфер AW2 посредством встряхивания.*

### **Биологические образцы**

Исходный материал для выделения и очистки ДНК – срезы с FFPE-блоков (в идеале свежие). Несколько срезов FFPE-блоков можно сочетать в одной процедуре. Если недостаточно информации о характере исходного материала, рекомендуется начинать процедуру не более чем с тремя срезами FFPE-блоков тканей.

Пользователь должен оптимизировать количество образцов, толщину и площадь поверхности срезов для любых процедур, осуществляемых в его лаборатории. Если набор будет использоваться далее в сочетании с другими продуктами QIAGEN, смотрите инструкции к этим продуктам.

### **Процедуры, помогающие избежать перекрестной контаминации**

Из-за чувствительности методов амплификации нуклеиновых кислот, необходимо соблюдать следующие меры безопасности при работе с колонками QIAamp MinElute во избежание кросс-контаминации между образцами:

- Не переполняйте пробирки образцом ткани.
- Для каждого FFPE-блока при соскабливании парафина используйте новый скальпель.
- Аккуратно наносите образец или раствор на колонку QIAamp MinElute пипеткой, не затрагиваясь до стенок колонки.
- Для каждой из переносимых жидкостей используйте новые наконечники дозаторов. Рекомендуются наконечники дозаторов с аэрозольным барьером.



- Всегда используйте новые промывочные пробирки при выполнении этапов промывки образцов.
- Убедитесь, что крышки пробирок полностью закрыты, перед тем, как перемешивать их в вортексе или центрифугировать.
- Убедитесь, что колонка QIAamp MinElute плотно закрыта перед центрифугированием.
- После этапов перемешивания и инкубирования при температуре 90°C центрифугируйте пробирки в течение короткого времени, чтобы собрать капли с внутренней стороны крышек.
- Открывайте только по одной колонке QIAamp MinElute за раз и избегайте образования аэрозолей.
- Всегда меняйте скальпели для новых образцов
- Всегда меняйте наконечники дозатора для разных жидкостей.
- Всегда надевайте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте их на возможное загрязнение материалом образца. Не используйте перчатки в случае подозрений на контаминацию.
- Открывайте по одной пробирке за раз.

### **Центрифугирование**

Колонки QIAamp MinElute соответствуют по размеру большинству стандартных 1,5-2 мл микроцентрифужных пробирок. Центрифугирование колонок QIAamp MinElute выполняется приблизительно при 6000 x g для снижения шума центрифуги. Центрифугирование на полной скорости не улучшает выход ДНК. Однако центрифугирование колонок QIAamp MinElute на полной скорости необходимо в двух случаях во время протокола: этап центрифугирования после промывки мембран для сушки и этап элюирования. Центрифугирование на полной скорости также необходимо для осаждения образца после обработки ксилолом и этапа промывки этанолом.

Все этапы центрифугирования должны выполняться при комнатной температуре (15-25°C).

### **Использование колонок QIAamp MinElute в микроцентрифуге**

- Всегда закрывайте колонки QIAamp MinElute перед размещением их в микроцентрифуге.
- Не дотрагивайтесь до мембраны колонки QIAamp MinElute наконечником дозатора.
- Отработанные растворы могут содержать некоторые опасные отходы и должны утилизироваться соответствующим образом.
- Для эффективной параллельной обработки нескольких образцов рекомендуется использовать штатив для промывочных пробирок, в которые могут быть перенесены колонки QIAamp MinElute после центрифугирования. Использованные промывочные пробирки, содержащие фильтраты, можно удалять в отходы, а новые промывочные пробирки, содержащие колонки QIAamp MinElute, можно размещать непосредственно в микроцентрифуге.

### **Элюирование очищенной ДНК**

Для приложений, которые требуют небольшие начальные объемы очищенной ДНК (например, некоторые анализы ПЦР), более концентрированный элюат может увеличить чувствительность анализа, но также может приводить к повышению концентрации потенциальных ингибиторов.

Увеличение элюирующего объема снижает концентрацию ДНК в элюате. Оптимизация элюирующего объема для процедур, используемых в лаборатории, является задачей пользователя. Если используются продукты QIAGEN для дальнейшего анализа, смотрите рекомендованные объемы в соответствующих инструкциях.

Объем элюата на выходе приблизительно на 5 мкл меньше объема Буфера АТЕ, добавляемого в колонку QIAamp MinElute. Например, элюирующий объем 20 мкл дает примерно 15 мкл элюата. Объем элюата на выходе также зависит от характера образца.

Выход ДНК может быть улучшен, если колонка инкубируется с Буфером АТЕ при комнатной температуре, например, в течение 5 минут до центрифугирования. Элюированную ДНК можно собирать в пробирки для элюирования 1,5 мл (входят в состав набора). Условия хране-



ния для элюированной ДНК зависят от требований, устанавливаемых пользователем. Если какие-либо продукты QIAGEN используются в последующем исследовании выделенной ДНК, рекомендуемые условия хранения для них смотрите в соответствующих инструкциях.

#### **14.1. Протокол: Выделение геномной ДНК из срезов FFPE-блоков**

##### **Процедура**

1. С помощью скальпеля срежьте лишний парафин с образца.
2. Приготовьте срезы в соответствии со стандартной лабораторной процедурой (см. подраздел «Биологические образцы»). Пользователь должен оптимизировать количество секций, толщину и площадь поверхности среза для любых процедур, используемых в его лаборатории. В течение всей процедуры необходимо обязательно сохранять прослеживаемость образцов.
3. Сразу же сделайте соскоб ткани из секций с помощью стерильного скальпеля в пробирку для лизиса LT (входит в состав набора). Убедитесь, что в пробирку помещен весь доступный образец ткани. Добавьте 1 мл ксилола в образец, закройте крышку и энергично перемешивайте в вортексе, пока парафин не растворится (например, 10 сек). Убедитесь, что пробирка полностью закрыта, чтобы избежать проливания ксилола и перекрестной контаминации между образцами.
4. Центрифугируйте на полной скорости в течение приблизительно 2 минут при комнатной температуре для сбора ткани в осадок. Если осадок собрать не удалось, повторите этот этап.
5. Соберите надосадочную жидкость с помощью дозатора и вылейте ее. Осадок сохраните. Надосадочная жидкость содержит ксилол, который является опасным отходом и должен утилизироваться в соответствующем порядке согласно регламенту.
6. Добавьте 1 мл этанола (96-100%) к осадку и тщательно перемешайте в вортексе. Этанол экстрагирует остаточный ксилол из образца и должен утилизироваться в соответствующем порядке.
7. Центрифугируйте на полной скорости в течение приблизительно 2 минут при комнатной температуре. Отберите надосадочную жидкость с помощью дозатора и вылейте ее. Не удаляйте осадок. Тщательно удалите остаточный этанол с помощью тонкого наконечника дозатора. Откройте пробирку и инкубируйте при температуре 15-40°C, пока не испарится остаточный этанол. Удаление остаточного этанола имеет критическое значения для успеха процесса выделения.

*Примечание: низкая температура инкубации замедляет время испарения, при этом более высокая температура может пересушить осадок.*

8. Ресуспендируйте осадок в 180 мкл Буфера ATL. Добавьте 20 мкл протеиназы K и перемешивайте в вортексе.

*Примечание: Осадок должен быть хорошо ресуспендирован в буфере ATL, чтобы обеспечить максимальное выход продукта.*

9. Проинкубируйте при температуре 56°C  $\pm$  3°C в течение приблизительно 1 часа (пока образец не будет полностью лизирован).
10. Проинкубируйте при температуре 90°C  $\pm$  5°C в течение 1 часа  $\pm$  5 мин. Инкубация при температуре 90°C в Буфере ATL частично восстанавливает нуклеиновую кислоту от формальдегида. Более короткое время инкубации или более низкие температуры инкубации могут повлиять на качество и количество ДНК. Если используется всего один нагревательный блок, оставьте образец при комнатной температуре после инкубации при 56°C, до момента пока нагревательный блок не достигнет 90°C.
11. Кратко центрифугируйте пробирку, чтобы удалить капли с внутренней части крышки.
12. Добавьте 200 мкл Буфера AL в образец и перемешайте в вортексе. Далее добавьте 200 мкл этанола (96-100%) и снова тщательно перемешайте в вортексе.

Для получения однородного раствора очень важно чтобы образец, Буфер AL и этанол сразу же были тщательно перемешаны в вортексе или методом пипетирования. Чтобы сэкономить время при обработке нескольких образцов, можно предварительно смешать Буфер AL и этанол и добавить их вместе. При добавлении Буфера AL и этанола может формироваться белый осадок. Этот осадок не влияет на эффективность выделения. Всегда используйте свежую смесь и утилизируйте ее немедленно после использования.



13. Центрифугируйте пробирку в течение короткого времени, чтобы удалить капли с внутренней части крышки.

14. Аккуратно перенесите весь лизат в колонку QIAamp MinElute (в промывочной пробирке WT 2 мл), не смачивая ее край, закройте крышку и центрифугируйте приблизительно при  $6000 \times g$  в течение  $\geq 1$  мин. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую промывочную пробирку WT (входит в набор) и утилизируйте промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

Если лизат не полностью прошел через мембрану после центрифугирования, снова центрифугируйте при более высокой скорости, пока колонка QIAamp MinElute не опустеет.

15. Аккуратно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл восстановленного Буфера AW1, не смачивая край колонки. Закройте крышку и центрифугируйте при приблизительно  $6000 \times g$  в течение  $\geq 1$  мин. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую промывочную пробирку WT 2 мл и утилизируйте промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

16. Аккуратно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл восстановленного Буфера AW2, не дотрагиваясь до края колонки. Закройте крышку и центрифугируйте приблизительно при  $6000 \times g$  в течение  $\geq 1$  мин. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую промывочную пробирку WT 2 мл и утилизируйте промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

Следует избегать контакта между колонкой QIAamp MinElute и фильтратом. Обязательно сбалансируйте ротор центрифуги. Проявляйте осторожность, вынимая колонку QIAamp MinElute и промывочную пробирку из ротора, чтобы фильтрат не входил в контакт с колонкой QIAamp MinElute.

17. Центрифугируйте при полной скорости (приблизительно  $20000 \times g$ ) в течение приблизительно 3 минут, чтобы высушить мембрану.

*Примечание: Перенос остатка этанола в элюат может влиять на ход дальнейшей процедуры.*

18. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую пробирку для элюирования ET 1,5 мл (входит в состав набора) и удалите промывочную пробирку, содержащую фильтрат. Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp MinElute и добавьте 20-200 мкл Буфера АТЕ по центру мембраны колонки.

*Важно: При использовании небольших элюирующих объемов (<50 мкл) распределите Буфер АТЕ по центру мембраны, чтобы обеспечить полное элюирование связанной ДНК. Колонки QIAamp MinElute предполагают гибкость выбора элюирующего объема. Выбирайте объем в соответствии с требованиями последующего применения. Объем элюата будет приблизительно на 5 мкл меньше объема раствора для элюирования, применимого к колонке.*

19. Закройте крышку и проинкубируйте при комнатной температуре ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) в течение не менее 1 минуты. Центрифугируйте при полной скорости (приблизительно  $20000 \times g$ ) в течение  $\geq 1$  минуты.

Инкубирование колонки QIAamp MinElute, с добавленным Буфером АТЕ, в течение приблизительно 5 минут при комнатной температуре перед центрифугированием, может увеличить выход ДНК.

## 15. Контроль качества

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit проходит испытание на соответствие установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

## 16. Эксплуатационные характеристики

### 16.1. Повторяемость

Повторяемость набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit проходила проверку на основании данных, полученных для  $\beta$ -актина методом ПЦР в реальном времени. Повторяемость оценивали с помощью статистического анализа с использованием значений стандартного отклонения компонентов дисперсии, полученных для значений Ct.



Для оценки повторяемости использовались стандартизированные FFPE-блоки, предоставленные компанией Acrometrix в качестве образцов для испытания. Четыре среза FFPE-блоков прошли обработку с использованием испытуемого набора, а 2 дополнительных среза прошли обработку с использованием эталонного набора. Кроме того, та же ПЦР выполнялась с геномной ДНК человека, которая не была обработана парафином, чтобы можно было оценить присутствие ингибиторов ПЦР в испытуемых образцах или сниженный выход или целостность (т.е. повышенную дегградацию) ДНК, что как можно предположить приведет к сдвигу  $C_t$  по сравнению со значениями  $C_t$  для ДНК из FFPE-блоков, выделенной эталонным набором.

Были выполнены два отдельных анализа с использованием эталона мастер-микс Quantitect SYBR Green Mastermix и праймеров, специфичных к гену  $\beta$ -актина на оборудовании Rotor-Gene Q. ПЦР выполнялась для фрагментов 174 bp и 218 bp гена  $\beta$ -актина человека. Значения  $C_t$ , полученные в этом эксперименте, использовались для статистического анализа.

Стандартное отклонение представляет собой повторяемость, включающую как повторяемость выделения, так и вариабельность ПЦР анализа  $\beta$ -актина. Полученные стандартные отклонения и 95% доверительные интервалы показаны для каждого из компонентов дисперсии в таблице 1.

Таблица 1. Результаты анализа компонентов дисперсии. Стандартное отклонение и 95% доверительный интервал, полученные для остаточной дисперсии, отражают повторяемость набора, определенную по  $\beta$ -актин ПЦР в реальном времени.

| Компонент дисперсии |                     | Стандартное отклонение | Нижний 95% доверительный интервал | Верхний 95% доверительный интервал | Процент общей дисперсии |
|---------------------|---------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|
| Участок ампликона   | Компонент дисперсии |                        |                                   |                                    |                         |
| 174 bp              | Остаточный          | 0,258                  | 0,220                             | 0,312                              | 50,96%                  |
| 174 bp              | Запуск              | 0,110                  | 0,052                             | 1,572                              | 9,30%                   |
| 174 bp              | Образец             | 0,228                  | 0,137                             | 0,646                              | 39,73%                  |
| 218 bp              | Остаточный          | 0,342                  | 0,291                             | 0,413                              | 50,37%                  |
| 218 bp              | Запуск              | 0,137                  | 0,065                             | 2,206                              | 8,14%                   |
| 218 bp              | Образец             | 0,310                  | 0,187                             | 0,870                              | 41,50%                  |

Вариативность, наибольшая из полученных, может считаться финальной повторяемостью и составляет 0,342  $C_t$ .

## 16.2. Воспроизводимость

Оценка воспроизводимости выделения выполнялась в трех лабораториях (межлабораторное исследование): QIAGEN Manchester (Соединенное Королевство), QIAGEN Hilden (Германия) и QIAGEN Germantown (США).

Экспериментальные условия варьировались для каждой лаборатории с использованием 2 различных аппаратов Rotor-Gene Q, 2 операторов и 2 партий ПЦР набора для каждой лаборатории. Во всех лабораториях использовалась одна и та же партия набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit для выделения ДНК.

В исследовании использовался Набор реагентов theascreen® EGFR RGQ PCR Kit для анализа мутаций в гене EGFR в образцах ткани методом ПЦР. Образцы включали срезы, полученные из клинических образцов FFPE-блоков немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), а также клеточные линии FFPE, полученные из клеточной линии аденокарциномы легкого человека (A549, из Американской коллекции типовых культур - ATCC), залитых в парафиновый блок для получения искусственного биопсийного образца. Стандарты FFPE использовались, когда отсутствовали клинические образцы из-за редкости мутации. Клинические образцы FFPE-блоков отбирались исходя из известного мутационного статуса в соответствии с отчетом о секвенировании по методу Сэнгера полученных клинических образцов.



Чтобы отвечать критериям приемлемости, не менее 90% сигналов мутаций (для всех лабораториях, образцов с мутациями и дикого типа) должны были быть корректными, а согласованность определения мутаций во всех лабораториях (как для образцов с мутациями, так и для образцов дикого типа) должна была быть 90% или выше.

Каждый исследовательский центр успешно продемонстрировал способность извлекать ДНК с помощью набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit из срезов FFPE-блоков. Доля правильных откликов мутаций (по всем лабораториям, выборкам мутаций и дикого типа) составила 99,7%. Для всех анализов, кроме G719X, были получены 100% правильные результаты на всех исследовательских площадках (таблица 2).

Таблица 2. Процент корректных сигналов мутаций.

| Мишень         | Количество | Согласованный отклик (количество) | Согласованный отклик (процент) | Нижний 90% двусторонний доверительный интервал |
|----------------|------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------------------|
| Всего          | 692        | 690                               | 99,7%                          | 99,1%                                          |
| делеции        | 454        | 454                               | 100,0%                         | 99,3%                                          |
| g719x          | 46         | 44                                | 95,7%                          | 86,9%                                          |
| вставки        | 72         | 72                                | 100,0%                         | 95,9%                                          |
| l858r          | 24         | 24                                | 100,0%                         | 88,3%                                          |
| l861q          | 24         | 24                                | 100,0%                         | 88,3%                                          |
| s768i          | 24         | 24                                | 100,0%                         | 88,3%                                          |
| t790m          | 24         | 24                                | 100,0%                         | 88,3%                                          |
| wt (дикий тип) | 24         | 24                                | 100,0%                         | 88,3%                                          |

Для каждого типа мутации из выборки (например, все мутации делеции, проанализированные вместе) также был определен нижний 95%-ный односторонний точный доверительный интервал (эквивалентный нижнему 90%-ному двустороннему доверительному интервалу). В таблице 3 показаны доли правильных откликов от мутации к мутации.

Таблица 3. Процент корректных сигналов мутаций (по отдельному типу мутации)

| Мишень        | Количество (общее) | Согласованный отклик (количество) | Корректный сигнал (процент) |
|---------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Всего         | 692                | 690                               | 99,7%                       |
| Делеции 12367 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12369 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12370 | 23                 | 23                                | 100,0%                      |
| Делеции 12382 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12393 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12384 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12387 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12419 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12422 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12678 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 12728 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 13551 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 6210  | 23                 | 23                                | 100,0%                      |
| Делеции 6218  | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 6220  | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 6223  | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 6225  | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 6254  | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Делеции 6255  | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| G719A         | 24                 | 22                                | 91,7%                       |
| G719S         | 22                 | 22                                | 100%                        |

| Мишень        | Количество (общее) | Согласованный отклик (количество) | Корректный сигнал (процент) |
|---------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| G719X         | 46                 | 44                                | 95,7%                       |
| Вставки 12376 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Вставки 12377 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Вставки 12377 | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| L858R         | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| L861Q         | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| S768I         | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| T790M         | 24                 | 24                                | 100,0%                      |
| Дикий тип     | 24                 | 24                                | 100,0%                      |

Для каждой выборки была определена воспроизводимость значений  $\Delta St$ , в частности стандартное отклонение и 95% доверительный интервал (таблица 3). Видно, что все стандартные отклонения воспроизводимости были равны или меньше 0,50. Все стандартные отклонения внутри исследовательских лабораторий были равны или меньше 0,45. Различия в средней  $\Delta St$  между центрами составляли до 0,76 St по величине (T790M центр 1 – центр 2) и не влияли на определение откликов мутаций.

Таблица 3. Воспроизводимость  $\Delta St$  (Общее стандартное отклонение по всем лабораториям).

| Мишень        | Стандартное отклонение | 95% нижний ДИ | 95% верхний ДИ |
|---------------|------------------------|---------------|----------------|
| делеции 12367 | 0,27                   | 0,22          | 0,36           |
| делеции 12369 | 0,46                   | 0,37          | 0,61           |
| делеции 12370 | 0,24                   | 0,20          | 0,33           |
| делеции 12382 | 0,26                   | 0,21          | 0,35           |
| делеции 12383 | 0,19                   | 0,16          | 0,26           |
| делеции 12384 | 0,34                   | 0,27          | 0,45           |
| делеции 12387 | 0,26                   | 0,21          | 0,34           |
| делеции 12419 | 0,38                   | 0,31          | 0,50           |
| делеции 12422 | 0,13                   | 0,10          | 0,17           |
| делеции 12678 | 0,36                   | 0,29          | 0,47           |
| делеции 12728 | 0,30                   | 0,24          | 0,39           |
| делеции 13551 | 0,32                   | 0,26          | 0,42           |
| делеции 6210  | 0,25                   | 0,20          | 0,34           |
| делеции 6218  | 0,42                   | 0,34          | 0,56           |
| делеции 6220  | 0,31                   | 0,25          | 0,41           |
| делеции 6223  | 0,24                   | 0,20          | 0,32           |
| делеции 6225  | 0,27                   | 0,22          | 0,36           |
| делеции 6254  | 0,50                   | 0,40          | 0,66           |
| делеции 6255  | 0,22                   | 0,18          | 0,29           |
| g719a         | 0,44                   | 0,36          | 0,59           |
| g719s         | 0,37                   | 0,30          | 0,50           |
| вставки 12376 | 0,27                   | 0,22          | 0,36           |
| вставки 12377 | 0,30                   | 0,24          | 0,40           |
| вставки 12378 | 0,38                   | 0,31          | 0,51           |
| l858r         | 0,34                   | 0,27          | 0,45           |
| l861q         | 0,47                   | 0,38          | 0,63           |
| s768i         | 0,35                   | 0,28          | 0,46           |
| t790m         | 0,38                   | 0,31          | 0,51           |



Эффективность подготовки образцов с мутациями онкогена EGFR, включающей несколько партий набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, также была продемонстрирована в другом исследовании, которое выполнялось в трех лабораториях (межлабораторное исследование): QIAGEN Manchester (Соединенное Королевство), QIAGEN Hilden (Германия) и QIAGEN Germantown (США). В исследовании использовались три клинических FFPE-блоков образца: в одном было определено содержание мутации делеция 6223, в другом было наличие мутации L858R, и один образец дикого типа (WT). Были исследованы 48 последовательных срезов FFPE-блоков для каждого из клинических образцов с мутациями, которые были рандомизированы в пары для использования в экстракции (всего 24 выделения). 24 пары секций FFPE были разделены на четыре партии (6 пар секций FFPE на партию, на образец; одна партия на испытательный центр и одна партия на случай непредвиденных обстоятельств). Для клинического образца FFPE дикого типа 36 последовательных срезов FFPE были рандомизированы в пары для использования в экстракции (всего 18 выделений). 18 пар секций FFPE были разделены на три партии (6 пар секций FFPE на партию, одна партия на испытательный полигон). Клинические FFPE образцы были отобраны на основе их известного мутационного статуса в соответствии с секвенированием по Сэнгеру.

Для каждого образца с мутацией применялись модель дисперсионного анализа, где  $\Delta Ct$  был в качестве переменной для запуска (случайный эффект внутри лаборатории) и лаборатории (случайный эффект между лабораториями). Были определены компоненты дисперсии в рамках одного запуска, различных запусков и различных лабораторий. Для всех образцов из трех лабораторий было продемонстрировано 100% соответствие откликов мутации (таблица 4). Расчетное стандартное отклонение и доверительные интервалы для значений  $\Delta Ct$  приведены в таблице 5.

Таблица 4. Процент корректных откликов мутаций для клинических FFPE образцов.

| Клинический FFPE образец | Количество положительных откликов | Количество отрицательных откликов | Общее количество | Процент корректных откликов | Нижний двусторонний 90% доверительный интервал | Верхний двусторонний 90% доверительный интервал |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| делеция 6223             | 18                                | 0                                 | 18               | 100.00%                     | 84.67%                                         | 100.00%                                         |
| L858R                    | 18                                | 0                                 | 18               | 100.00%                     | 84.67%                                         | 100.00%                                         |
| wt                       | 0                                 | 18                                | 18               | 100.00%                     | 84.67%                                         | 100.00%                                         |

Таблица 5. Стандартное отклонение и доверительные интервалы для  $\Delta Ct$ .

| Клинический FFPE образец | Стандартное отклонение | Нижний 95% доверительный интервал | Верхний 95% доверительный интервал |
|--------------------------|------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| делеция 6223             | 0.24                   | 0.20                              | 0.32                               |
| L858R                    | 0.34                   | 0.27                              | 0.45                               |

Общее согласованность правильных откликов мутаций составило 18 из 18 (100%). Каждая лаборатория успешно продемонстрировала способность воспроизводимо выделять ДНК с помощью набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

### 16.3. Перекрестное загрязнение

Выделение ДНК набором QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit была протестирована на предмет кросс-контаминации от образца к образцу в рамках исследования для набора theascreen® EGFR PCR RGQ Kit.

Использовали два образца FFPE клеточной линии: дикого типа и образец FFPE клеточной линии, несущий мутацию экзона 21 L858R. Мутация L858R была выбрана, поскольку она пред-



ставляет собой наиболее распространенную мутацию онкогена EGFR. Исследование было направлено на имитацию ситуации, когда образцы с высоким содержанием мутации L858R ( $\Delta C_t$  образцов составляла от -0,23 до 0,89) могут привести к перекрестному загрязнению других образцов в процессе выделения. Исследование проводилось более пяти последовательных дней и состояло из десяти тестовых запусков, предназначенных для изучения возможности загрязнения образцов как во время, так и между выделениями.

Для проверки процедуры выделения ДНК проводилось из образцов с мутацией L858R, расположенных рядом с образцами дикого типа, с использованием одной партии набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Результаты этого исследования указывают на отсутствие обнаруживаемого перекрестного загрязнения как внутри процедуры выделения, так и между циклами. Анализ показал, что для 330 действительных повторов образца дикого типа не было ложноположительных вызовов.

Аналогичное исследование было проведено для системы theascreen® KRAS RGQ PCR Kit. Чтобы продемонстрировать отсутствие перекрестного загрязнения, ПЦР набор должен был правильно идентифицировать все тестовые образцы дикого типа как отрицательные по мутации и правильно идентифицировать все тестовые образцы с мутацией 12Ala как положительные по мутации 12Ala.

Результат показал отсутствие поддающейся обнаружению кросс-контаминации в рамках цикла выделения и между разными циклами, поскольку ни один из действительных результатов образца ДНК дикого типа не был неверным

#### **16.4. Интерферирующие вещества**

Набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit можно использовать для выделения ДНК из различных типов ткани. Потенциально интерферирующие вещества могут происходить из различных источников, например, естественные метаболиты, специфичные для типа ткани и органа, метаболиты, вырабатываемые во время патологических состояний, вещества, вводимые во время лечения пациента, или вещества, употребляемые пациентом. Широкий спектр потенциально интерферирующих веществ и разнообразие последующих диагностических наборов и методов не дают возможности надежно и достоверно установить воздействие интерферирующих веществ исключительно на выделение ДНК без исследования влияния на конкретную дальнейшую реакцию. Пользователям рекомендуется провести контроль возможных интерферентов для конкретной ткани с использованием реагентов, специфичных для дальнейшего диагностического применения.

#### **16.5. Чувствительность, специфичность и точность**

Поскольку набор для экстракции не предназначен для прямых измерений (является преаналитическим), невозможно установить чувствительность, специфичность и точность в отрыве от последующих применений. Кроме того, точность метода не может быть проверена, поскольку не существует ни сертифицированного эталонного стандарта, ни валидированного эталонного метода.

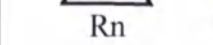
#### **16.6. Выход ДНК**

Рабочие характеристики набора подтверждаются исходя из концентрации и чистоты получаемой ДНК, а также функциональным анализом для нескольких дальнейших исследований, таких, как обнаружение мутаций в онкогене KRAS, анализ мутаций в гене EGFR, 8-плексная конечная ПЦР человека и амплификация целого генома с дальнейшим секвенированием по методу Сэнгера. Все соответствующие критерии приемлемости и требования к изделию были выполнены. Элюированная геномная ДНК была пригодна для использования в различных дальнейших анализах.

### **17. Маркировка**

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие обозначения:



|                                                                                     |                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|    | Содержит реагенты, достаточные для тестов <N>                   |
|    | Смотрите инструкции по применению                               |
|    | Использовать до                                                 |
|    | Для диагностики In vitro                                        |
|    | Каталожный номер                                                |
|    | Номер партии                                                    |
|    | номер материала                                                 |
|    | Компоненты                                                      |
|    | Объем                                                           |
|    | Диапазон температур                                             |
|    | Производитель                                                   |
|    | По прибытии                                                     |
|   | Открыть при доставке; храните колонки QIAamp MinElute при 2-8°C |
|  | Запишите текущую дату после добавления этанола во флакон        |
|  | Добавление                                                      |
|  | Содержит                                                        |
|  | Восстановить в                                                  |
|  | Этанол                                                          |
|  | Гуанидин гидрохлорид                                            |
|  | Малеиновая кислота                                              |
|  | Глобальный торговый номер                                       |
|  | Внимание!                                                       |
|  | R - версия инструкции, а n - номер пересмотра                   |
|  | Приводит к                                                      |

## 18.Требование к охране окружающей среды.

Медицинское изделие при использовании, транспортировке и хранении, не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду.

## 19.Утилизация

Чтобы избежать возможного загрязнения окружающей среды, изделие с истекшим сроком годности, отходы использованных реагентов, а также, в случае видимых повреждений индивидуальной упаковки, изделие должно утилизироваться местными публично-правовыми организациями, в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

На территории Российской Федерации набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit должен утилизироваться в соответствии с нормативными требованиями для отходов класса Б – после

химических методов обеззараживания и аппаратных способов обеззараживания с применением физических методов в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21).

## 20. Контактная информация

Техническую поддержку и дополнительную информацию можно получить в центре технической поддержки по ссылке [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), позвонив по номеру 00800-22-44-6000, или обратившись в отдел технической поддержки QIAGEN или к местным дистрибьюторам (см. на сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## 21. Гарантийные обязательства

Компания QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ) принимает на себя гарантийные обязательства в отношении медицинского изделия по отсутствию дефектов и соответствию заявленным производителем характеристикам в течение всего срока годности, при соблюдении условий, указанных в инструкции по применению.

Производитель не несёт ответственности за повреждения или несчастные случаи в результате неправильного использования, ошибки пользователя или внешних чрезвычайных ситуаций. По вопросам качества продукции обращайтесь к уполномоченному представителю производителя.

## 22. Рекламации

### Производитель/разработчик медицинского изделия:

QIAGEN GmbH / КАЙДЖЕН ГмбХ

Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany/ Кайджен Штрассе 1, 40724 Хильден, Германия

Номер телефона: +49-02103-29-0

Адрес электронной почты: [info@qiagen.com](mailto:info@qiagen.com);

Сайт: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

### Уполномоченный представитель производителя на территории Российской Федерации:

Общество с ограниченной ответственностью "Кайджен РУС" (ООО "Кайджен РУС")

Россия, 123112, г. Москва, Пресненская набережная, дом 6, строение 2, этаж 50, помещение 5001

Номер телефона: +7 499 703 15 56

Адрес электронной почты: [qiagenrus@qiagen.com](mailto:qiagenrus@qiagen.com)

## 23. Редакция документа

| Дата             | Изменения                                              |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| R3, февраль 2017 | Обновлен раздел Предупреждения и меры предосторожности |



КАЙДЖЕН ГмбХ  
Кайджен штрассе 1  
40724 Хильден  
Германия

Номер по реестру 1741/2021 М

Настоящим подтверждаю, что подпись и печать на прилагаемом документе подтвердил  
в моем присутствии

г-н д-р Бартольд Пиэнинг, род. 19 ноября 1958 г.  
служебный адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,  
лично мне известный.

Г-н д-р Бартольд Пиэнинг действует не от своего имени, а от имени компании

**«КАЙДЖЕН ГмбХ»**  
(Адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,

После сверки с электронным торговым реестром Дюссельдорфа, запись под  
№ HR В 45822 I, я удостоверяю, что

- в него внесена компания «КАЙДЖЕН ГмбХ» со штаб-квартирой в г. Хильден;
- в нем зарегистрирован г-н Бартольд Пиэнинг в качестве Управляющего дирек-  
тора, который всегда вправе представлять Компанию единолично по любому во-  
просу;
- Г-н д-р Бартольд Пиэнинг всегда освобожден от ограничений на заключение сде-  
лок с самим собой в соответствии с § 181 Гражданского кодекса Германии («ГК»).

Хильден , 11 августа 2021 года  
Д-р Никлас Майрозе  
Официальный нотариус  
Миттельштрассе 36-38, 40721, Хильден, Германия

[Круглая гербовая печать:  
Д-р Никлас Майрозе  
нотариус в Хильдене]

[Круглая гербовая печать:  
Д-р Никлас Майрозе  
нотариус в Хильдене]

Текст данного документа перевёл переводчик Сербигешева Ольга Анатольевна. Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является правильным, точным и полным.

Российская Федерация  
Город Москва

Двадцатого августа две тысячи двадцать первого года.

Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия Валерьевича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Сербигешевой Ольги Анатольевны.

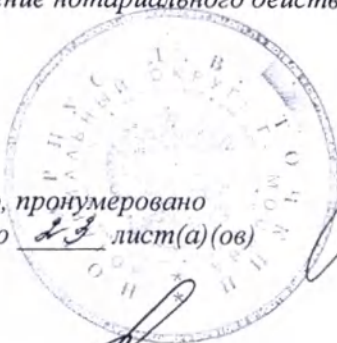
Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021-

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.

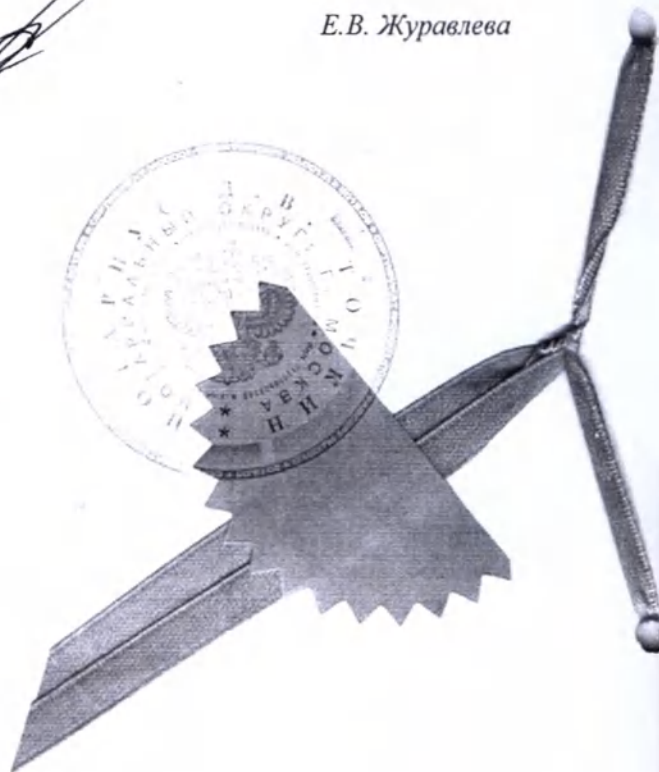
77-1045



Е.В. Журавлева

Всего прошнуровано, пронумеровано  
и скреплено печатью 23 лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса





Российская Федерация

Город Москва  
23 АВГ 2021

Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия Валерьевича, свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: N 77/2079-н/77-2021-11-1209

Уплачено за совершение нотариального действия: 1500

Е.В. Журавлева



Всего прошнуровано,  
пронумеровано и скреплено  
печатью 25

листов.

Нотариус *а*



КОПИЯ

«УТВЕРЖДАЮ» / "APPROVE"  
QIAGEN GmbH

Управляющий директор / Managing Director  
(должность/position)

Бартхолд Пиэнинг / Barthold Piening  
(имя/name)

(подпись/signature)

М.П. / Stamp

QIAGEN GmbH  
QIAGEN Straße 1  
40724 Hilden  
Germany

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов

# Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



50

Версия 2

IVD

Для диагностики in vitro



REF

61104



QIAGEN GmbH  
(КАЙДЖЕН ГМБХ)

Qiagen Str. 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)

R2

MAT

1123047





Deed Roll No. **1739** / 2021 M

I hereby certify that signature on the document affixed and sealed hereto was authenticated before me by

Mr. Dr. Barthold Piening, born on 19. November 1958,  
business address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden,  
who is personally known to me.

Mr. Dr. Barthold Piening not acting in own matter, but on behalf of

**QIAGEN GmbH**

(Address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden).

Upon my inspection to the electronic Commercial register of Düsseldorf under HR B 45822 I hereby certify that:

- there the Company QIAGEN GmbH with headquarters in Hilden is listed;
- there Mr. Dr. Barthold Piening as Managing Director is registered and always empowered to represent the Company solely in each matter;
- Mr. Dr. Barthold Piening is always relieved from the restrictions on self-contracting according to § 181 of the German Civil Code ("BGB").

I could not inform myself about the content of the certified document because I do not master the language of the document. The notarization does not refer to the correctness of the document.

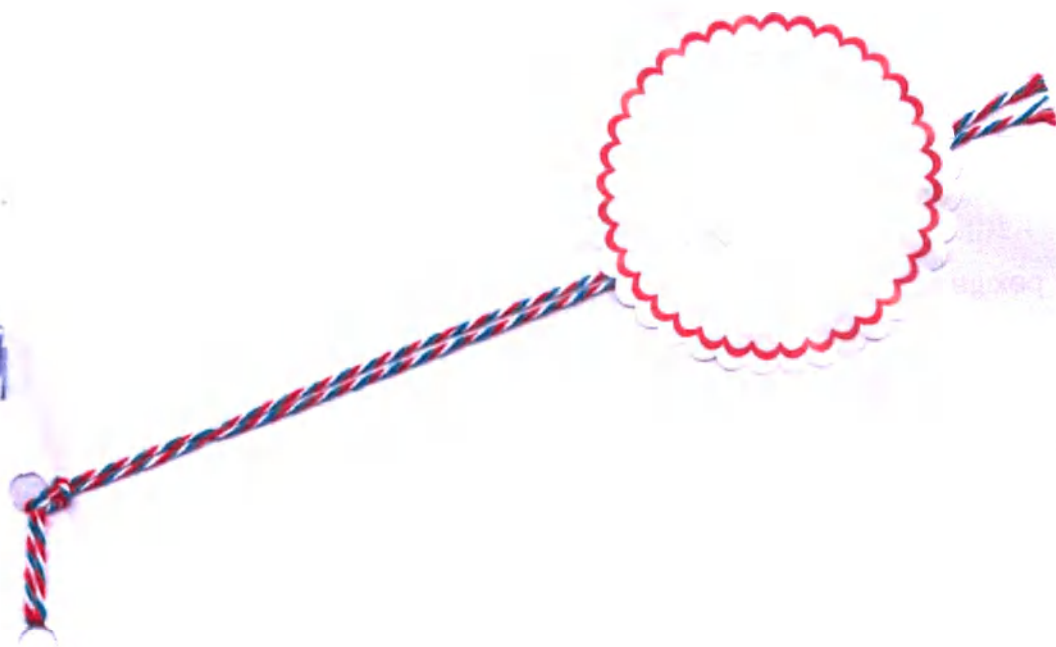
Hilden, 11 August 2021



Dr. Niklas Mairose

Notary public

Mittelstraße 36-38, 40721 Hilden, Germany





## Оглавление

|       |                                                                                          |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Наименование изделия                                                                     | 5  |
| 2.    | Производитель                                                                            | 5  |
| 3.    | Назначение, показания к применению, противопоказания.                                    | 5  |
| 4.    | Сведения о потенциальных потребителях                                                    | 6  |
| 5.    | Общие сведения                                                                           | 6  |
| 6.    | Принцип действия                                                                         | 6  |
| 7.    | Комплектность набора                                                                     | 8  |
| 8.    | Необходимые материалы, не входящие в комплект набора                                     | 8  |
| 9.    | Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения | 9  |
| 10.   | Предупреждения и меры предосторожности                                                   | 9  |
| 11.   | Срок годности.                                                                           | 11 |
| 12.   | Хранение и перемещение реагентов                                                         | 11 |
| 13.   | Хранение образцов и обращение с ними                                                     | 12 |
| 14.   | Процедура                                                                                | 13 |
| 14.1. | Протокол: Выделение геномной ДНК из образцов крови с использованием вакуума              | 15 |
| 14.2. | Протокол: Выделение геномной ДНК из образцов крови с использованием микроцентрифуги      | 17 |
| 15.   | Контроль качества                                                                        | 18 |
| 16.   | Эксплуатационные характеристики                                                          | 18 |
| 16.1. | Выход очищенной ДНК                                                                      | 18 |
| 16.2. | Производительность в последующих анализах                                                | 19 |
| 16.3. | Исследуемый образец                                                                      | 19 |
| 16.4. | Объем буфера для элюирования                                                             | 20 |
| 16.5. | Сравнение центрифугирования и вакуумной процедуры                                        | 20 |
| 16.6. | Прецизионность                                                                           | 20 |
| 17.   | Маркировка                                                                               | 20 |
| 18.   | Требование к охране окружающей среды.                                                    | 21 |
| 19.   | Утилизация                                                                               | 21 |
| 20.   | Контактная информация                                                                    | 22 |
| 21.   | Гарантийные обязательства                                                                | 22 |
| 22.   | Рекламации                                                                               | 22 |
| 23.   | Редакция документа                                                                       | 22 |
|       | Приложение А: Автоматизированный процесс выделения с использованием станции QIAcube      | 22 |

### **КАЙДЖЕН, Технологии для отбора образцов и проведения анализов**

Компания QIAGEN — ведущий поставщик инновационных технологий отбора и анализа проб, позволяющих выделять и распознавать компоненты любых биологических образцов. Наши высокотехнологичные продукты и услуги отличаются высоким качеством и обеспечивают успех на всех этапах работы, от взятия образца до получения результата анализа.

QIAGEN задает стандарты в таких областях, как:

- Очистка ДНК, РНК и белков
- Анализ нуклеиновых кислот и белков
- Исследование микро-РНК и РНК-интерференции
- Автоматизация технологических процессов отбора и анализа проб

Наша миссия заключается в том, чтобы помогать вам добиваться выдающихся успехов и совершать прорывы. Более подробную информацию см. на веб-сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).



## **1. Наименование изделия**

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения:

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit:

1. Центрифужные колонки QIAamp Mini с промывочными пробирками (2 мл) WT (50 шт.).
2. Пробирки для элюирования (1,5 мл) ET (50 шт.).
3. Коннекторы VacConnectors VC (50 шт.).
4. Пробирки для лизиса (1,5 мл) LT (50 шт.).
5. Промывочные пробирки (2 мл) WT (3 x 50 шт.).
6. Буфер для лизиса (12 мл) AL (1 шт.).
7. Промывочный буфер 1 (концентрат) (19 мл) AW1 (1 шт.).
8. Промывочный буфер 2 (концентрат) (13 мл) AW2 (1 шт.).
9. Элюирующий буфер (25 мл) AE (1 шт.).
10. Растворитель протеазы (2 мл) PS (1 шт.).
11. Протеиназа QIAGEN (165 мкл) (1 шт.).
12. Инструкция по применению.

## **2. Производитель**

QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ)

Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)

Номер телефона: +49-02103-29-0

Адрес электронной почты: [info@qiagen.com](mailto:info@qiagen.com);

Сайт: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

## **3. Назначение, показания к применению, противопоказания.**

### **Назначение**

Для выделения нуклеиновых кислот из\* биологических образцов методом селективного связывания на мембране из диоксида кремния.

### **Описание**

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (далее набор, набор реагентов, QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit) представляет собой систему, использующую технологию селективного связывания ДНК на мембране из диоксида кремния (QIAamp технология) из образцов цельной крови.

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit - это готовое к использованию медицинское изделие для выделения и очистки геномной ДНК из свежих образцов цельной крови или крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Набор рассчитан на обработку 50 образцов.

Время полного цикла анализа с использованием набора не превышает 90 минут.

### **Показания к применению**

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit предназначен для выделения нуклеиновых кислот в качестве этапа пробоподготовки для последующего анализа очищенных нуклеиновых кислот в клинической лабораторной диагностике, в частности методом ПЦР.

Является преаналитическим методом, набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit предназначен для подготовки образцов, но не для получения результатов исследований, качественных или количественных.

### **Противопоказания к применению**

При использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.

#### 4. Сведения о потенциальных потребителях

Набор должен использоваться только квалифицированным персоналом (лаборантами или врачами клинической лабораторной диагностики, владеющими методами молекулярно-биологических исследований для диагностики *in vitro*) в условиях профессиональной клиничко-диагностической лаборатории. Пользователь также должен иметь навыки, необходимые для правильного выполнения исследований, описанных в данной инструкции по применению.

Медицинское изделие предназначено только для профессионального использования. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

#### 5. Общие сведения

В наборе QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit используется испытанная технология, обеспечивающая быстрый и легкий способ выделения и очистки геномной ДНК из 200 мкл цельной крови.

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit позволяет одновременно обрабатывать несколько образцов крови, дает очищенную ДНК, готовую к использованию в дальнейших приложениях. Процедура подходит для использования со свежей или замороженной цельной кровью и кровью с ЭДТА.

Многие процедуры с использованием колонок QIAamp Mini могут быть полностью автоматизированы на станции выделения нуклеиновых кислот QIAcube для повышения надежности и простоты использования (см. Приложение А).

Предварительное разделение лейкоцитов не требуется. Протокол выделения не требует ни экстракции фенолом/хлороформом, ни осаждения спиртом и сводит к минимуму операции пользователя, что позволяет безопасно обращаться с потенциально инфицированными образцами. Процедура разработана таким образом, чтобы свести к минимуму перекрестное загрязнение между образцами. Очищенная ДНК готова к использованию в ПЦР или других приложениях или, в качестве альтернативы, может храниться при температуре от -25°C до -15°C для последующего использования.

#### 6. Принцип действия

Каждая процедура выделения ДНК набором QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit состоит из 4 этапов:

- Лизис клеток в образце крови
- Связывание геномной ДНК в клеточном лизате с мембраной центрифужной колонки QIAamp Mini
- Промывка мембраны
- Элюирование чистой геномной ДНК из мембраны

В настоящем руководстве представлены 2 протокола для QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit: процедура с использованием центрифугирования, и процедура, для которой требуется вакуумная система (рис.1). Кроме того, процедура выделения может быть автоматизировано с использованием станций выделения и очистки нуклеиновых кислот QIAcube.

##### Лизис клеток крови

Образцы проходят лизис при денатурирующих условиях при повышенных температурах. Лизис осуществляется в присутствии Протеиназы QIAGEN (QP) и буфера для лизиса (AL).

##### Связывание геномной ДНК с мембраной центрифужной колонки QIAamp Mini

Для оптимизации связывания геномной ДНК с мембраной колонки QIAamp Mini сначала в лизаты добавляется этанол. Далее лизат переносится в



центрифужную колонку QIAamp Mini и геномная ДНК адсорбируется на мембране из диоксида кремния при прохождении лизата через мембрану под воздействием вакуума или центробежной силы.



Рисунок 1. Процедуры выделения набором QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

#### Удаление остаточных загрязнений

В то время как геномная ДНК остается связанной с мембраной колонки QIAamp Mini загрязнения эффективно вымываются с помощью промывочного буфера 1 AW1 и промывочного буфера 2 AW2.

#### Элюирование чистой геномной ДНК

Геномная ДНК элюируется с мембраны колонки QIAamp Mini с использованием 50-200 мкл элюирующего буфера (AE). Элюированная ДНК готова к использованию для различных дальнейших исследований.

Объем ДНК, вымываемой из центрифужной колонки QIAamp Mini, может быть на 20 мкл меньше объема Элюирующего буфера (АЕ), вносимого в колонку. Объем элюата также зависит от характера образца. Элюирующий буфер (АЕ) должен быть доведен до комнатной температуры (15-25°C) перед нанесением в колонку. Элюированную ДНК собирают в пробирки для элюирования (ЕТ). Если требуется хранение ДНК до 4х недель, рекомендуется хранить ее при 2-8°C. В случае длительного хранения рекомендуется хранение при температуре -20°C.

#### Выход и количество геномной ДНК

Выход и количество выделенной геномной ДНК подходит для многих типов исследований в молекулярной диагностике. Дальнейшие диагностические анализы следует проводить в соответствии с инструкциями производителей на используемые реагенты.

## 7. Комплектность набора

### Состав набора

| Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit |                                                                     |                        |            |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------|------------|
| Каталожный номер                    |                                                                     |                        | 61104      |
| Количество реакций                  |                                                                     |                        | 50         |
| Обозначение                         | Описание                                                            | Идентификация          | Количество |
| QIAamp Mini Spin                    | Центрифужные колонки QIAamp Mini с промывочными пробирками (2мл) WT | <b>COL</b>             | 50 шт      |
| ЕТ                                  | Пробирки для элюирования (1,5мл) ЕТ                                 | <b>ELU TUBE</b>        | 50 шт      |
| VC                                  | Коннекторы VacConnectors VC                                         | <b>VAC CON</b>         | 50 шт      |
| LT                                  | Пробирки для лизиса (1,5мл) LT                                      | <b>LYS TUBE</b>        | 50 шт      |
| WT                                  | Промывочные пробирки (2мл) WT                                       | <b>WASH TUBE</b>       | 3 x 50 шт  |
| AL                                  | Буфер для лизиса* (12мл) AL                                         | <b>LYS BUF</b>         | 1 шт       |
| AW1                                 | Промывочный буфер 1* (концентрат) (19мл) AW1                        | <b>WASH BUF 1 CONC</b> | 1 шт       |
| AW2                                 | Промывочный буфер 2** (концентрат) (13мл) AW2                       | <b>WASH BUF 2 CONC</b> | 1 шт       |
| АЕ                                  | Элюирующий буфер ** (25мл) АЕ                                       | <b>ELU BUF</b>         | 1 шт       |
| PS                                  | Растворитель протеиназы** (2мл) PS                                  | <b>QPROT SOLV</b>      | 1 шт       |
| QP                                  | Протеиназа QIAGEN (165мкл)                                          | <b>QPROT</b>           | 1 шт       |
| Инструкция по применению            |                                                                     |                        | 1 шт       |

\* содержит гидрохлорид гуанидина.

\*\* содержит азид натрия в качестве консерванта

*Примечание: При работе с химикатами всегда надевайте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта или в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).*

## 8. Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- Этанол (96-100%)\*
- Пипетки (регулируемые) и наконечники для пипеток, свободные от нуклеаз (во избежание перекрестного загрязнения рекомендуются наконечники для пипеток с аэрозольными барьерными фильтрами)



- Термомиксер или нагревательный блок\*\* для лизиса при 56°C
- Микроцентрифуга\*\* (с ротором на 1,5 и 2 мл пробирки)
- Вортекс
- Лабораторный цилиндр (50мл)
- Для образцов менее 200 мкл: 0,9% раствор NaCl
- Для вакуумной процедуры:
- Вакуумный насос создающий вакуум от -800 до -900 мбар, (кат. № 84010, 84020 QIAGEN или аналог), Вакуумный коллектор (QIAvac 24 Plus кат.№ 19413 QIAGEN или аналог), Опционально (на выбор): VacValves (кат. № 19408 QIAGEN) или аналог).

\* не используйте денатурированный этанол, который содержит примеси метанола и метилэтилкетона

\*\* убедитесь, что инструменты проверены и откалиброваны согласно рекомендациям производителя

## 9. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения

Лекарственные средства, материалы человеческого и животного происхождения: не используются.

## 10. Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*

### Правила техники безопасности

При работе с химикатами всегда используйте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки.

Для получения дополнительной информации ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности (SDS). Эти паспорта можно получить в компактном и удобном формате PDF на сайте [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), где можно найти, распечатать SDS каждого набора компании QIAGEN и каждого компонента в наборе. Утилизацию образцов и отходов после анализа следует проводить в соответствии с местными нормами безопасности.

### Общие меры предосторожности

Следует всегда обращать внимание на следующее:

- Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.
- Анализ следует проводить с образцами крови
- Следует допускать к работе только обученный персонал.
- Следует использовать одноразовые перчатки без талька талька, халат и защитные очки. Для получения дополнительной информации по безопасности можно обратиться к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые размещены в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).
- Запрещается использовать набор или компоненты с истекшим сроком годности и/или поврежденной упаковкой компонентов набора.
- Со всеми образцами следует обращаться как с потенциально биологически опасными веществами. Утилизацию образцов и отходов на различных стадиях обработки образца следует проводить в соответствии с местными/национальными правилами утилизации через уполномоченные организации в данном регионе.
- До, вовремя и после применения этого набора, все потенциально опасные материалы (то есть материалы, которые могли войти в контакт с



клиническими образцами), включая пробирки, наконечники и прочие материалы, следует обрабатывать и утилизировать в соответствии с применимыми и соответствующими муниципальными / правительственными нормами, действующими в месте применения этого продукта.

- Не следует хранить открытыми флаконы с реагентами.
- Следует использовать калиброванные пипетки и инструменты.
- Следует использовать наконечники с фильтрами для пипеток
- Все поставляемые реагенты в наборах предназначены для использования только с другими реагентами из того же набора. Не следует заменять реагенты из набора на реагенты из других наборов, в том числе аналогичных, так как это может снизить эффективность работы.

*Примечание: Набор реагентов не содержит материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным*

### Предупреждения



**ВНИМАНИЕ: не добавляйте отбеливатель или кислотные растворы непосредственно в отходы, содержащие буфер AL и буфер AW1**

Буферы AL и AW1 содержат гуанидингидрохлорид, который способен создавать высоко реакционноспособные вещества при соединении с отбеливателем.

В случае пролива жидкости, содержащей вышеперечисленные буферы, необходимо произвести очистку с использованием лабораторных детергентов и воды. Если разлитая жидкость потенциально инфицирована, сначала очистите зараженную зону лабораторным детергентом и водой, а затем 1 % раствором (объемного содержания) гипохлорита натрия.

В случае повреждения или протекания флаконов с буфером, наденьте перчатки и защитные очки во время утилизации флаконов, чтобы избежать вреда для своего здоровья и здоровья окружающих.

Компания QIAGEN не проводила испытаний жидких отходов, получаемых после выполнения процедур с использованием набора, на остаточные инфекционные материалы. Загрязнение жидких отходов остаточными инфекционными материалами маловероятно, но ее не стоит полностью исключать. Следовательно, жидкие отходы необходимо считать инфекционными, обрабатывать и утилизировать в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

К компонентам набора реагентов QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit применяются следующие коды риска и безопасности.

|                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Буфер AL,<br/>Буфер AW1</b></p> | <p>Содержит гуанидин гидрохлорид.<br/>Может представлять опасность при попадании в пищеварительный тракт или дыхательные пути. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу в случае плохого самочувствия. Утилизируйте раствор/контейнер в специализированной установке, предназначенной для утилизации отходов. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз и лица.</p> |
| <p><b>Протенназа<br/>QIAGEN</b></p>   | <p>Содержит субтилизин.<br/>Вызывает умеренное раздражение кожи. Вызывает серьезное повреждение глаз. Вызывает аллергическую реакцию, приступ астмы или затрудненное дыхание в случае попадания в дыхательные пути. Не вдыхайте пыль/пары/газ/испарения/распыленный продукт.<br/>Утилизируйте раствор/контейнер в специализированной установке,</p>                                                                                                                 |





предназначенной для утилизации отходов. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу. В случае попадания в глаза промойте глаза водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если есть. Продолжайте промывать глаза. При попадании в дыхательные пути: в случае затрудненного дыхания перенесите пострадавшего на свежий воздух и оставьте его в покое, в положении, удобном для дыхания. Немедленно обратитесь в токсикологический центр или к врачу. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз и лица. Используйте средства для защиты дыхательных путей.

## Ограничения

Эффективность набора была определена при использовании цельной крови для выделения геномной ДНК из цельной крови.

Для достижения оптимальных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению. Не рекомендуется разбавление реагентов, отличное от описанного в данной инструкции, которое приводит к потере производительности.

Следует обратить внимание на сроки годности и условия хранения, указанные на упаковке и этикетках всех компонентов. Не используйте просроченные или неправильно хранящиеся компоненты.

Для того, чтобы минимизировать риск неправильной интерпретации результатов последующей диагностики, необходимо использовать надлежащие контроли при последующих исследованиях.

Любые полученные диагностические результаты следует толковать вместе с другими клиническими или лабораторными данными.

## 11.Срок годности.

Срок годности набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit составляет 24-месяца. Изделие стабильно до истечения срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Условия хранения реагентов: при температуре 15-25°C,

Условия хранения колонок QIAamp Mini - при температуре 2-8°C.

Условия транспортирования: при температуре от -20 до +45°C.

Если изделие предназначено только для периодического применения, после вскрытия флаконов, реагенты необходимо хранить при температуре 15-25°C не более 6 месяцев или до указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.

После истечения срока годности изделие использовать запрещено.

## 12.Хранение и перемещение реагентов

Колонки QIAamp Mini должны храниться в при температуре 2–8°C после прибытия.

Все буферы могут храниться при комнатной температуре (15–25°C).

Леофилизирующая Протеиназа QIAGEN (QP) может храниться при комнатной температуре (15-25°C) до окончания срока годности без ухудшения характеристик.

Протеиназа QIAGEN (QP), восстановленная в растворителе протеиназы (PS), остается стабильной в течение одного года при хранении при температуре 2-8 °C, но не дольше даты окончания срока годности, указанного для набора. Следует избегать хранения восстановленной протеиназы QIAGEN при комнатной температуре продолжительный период времени.

Восстановленный промывочный буфер 1 (AW1) и восстановленный промывочный буфер 2 (AW2) при хранении при комнатной температуре (15-25°C)

стабильны в течение 1 года, но не дольше даты окончания срока годности, указанного для набора

Срок хранения Набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit после вскрытия – 6 месяцев.

### 13. Хранение образцов и обращение с ними

Криопреципитаты, формирующиеся при размораживании замороженных образцов, закупоривают мембрану колонки QIAamp Mini. Если криопреципитаты видны визуально, их можно осадить путем центрифугирования при 6800 x g в течение 3 минут. Раствор должен использоваться сразу.

Замораживание и размораживание образцов крови не более 3 раз не оказывает существенного эффекта на выделение ДНК с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (см. Рисунок 2).

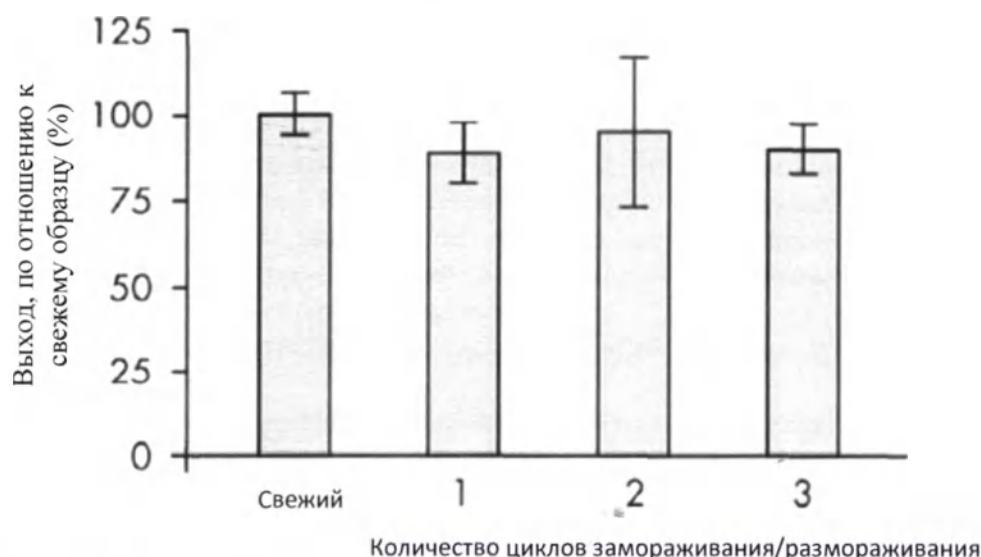


Рисунок 2. Эффект замораживания и размораживания образцов крови. Кровь, обработанная ЭДТА, подвергалась замораживанию и размораживанию до 3 раз, а далее проходила процесс выделения ДНК с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Рассчитанные выходы ДНК нормализованы к выходу из свежего образца (100%). Каждый столбец на графике представляет собой результаты исследования 32 образцов (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение).

Количество ДНК, выделяемой набором QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, зависит от содержания лейкоцитов в образце крови. Геномную ДНК выделяют из 200 мкл образцов крови. Для процедуры QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit могут использоваться различные пробирки для сбора крови и антикоагулянты (табл.1), однако рекомендуется использование ЭДТА в качестве антикоагулянта, что не приводит к последующим ошибкам в анализе выделенной ДНК, в частности методом ПЦР.

Таблица 1. Средний выход ДНК в зависимости от пробирок для сбора крови и антикоагулянта.

| Пробирки сбора крови | Производитель | Каталожный № | Объем, мл | Средний выход* |
|----------------------|---------------|--------------|-----------|----------------|
| BD® Vacutainer® 9NC  | BD            | 366007       | 9         | 6.4 мкг        |



|                   |                  |             |     |         |
|-------------------|------------------|-------------|-----|---------|
| BD Vacutainer K3E | BD               | 36847       | 10  | 6.6 мкг |
| BD Vacutainer K2E | BD               | 367864      | 6   | 6.4 мкг |
| S-Monovette® EDTA | Sarstedt®        | 02.1066.001 | 9   | 6.5 мкг |
| S-Monovette CPDA1 | Sarstedt         | 01.1610.001 | 8.5 | 6.3 мкг |
| Vacurette® K3E    | Greiner Bio-One® | 455036      | 9   | 6.5 мкг |
| Vacurette 9NC     | Greiner Bio-One  | 454382      | 2   | 6.3 мкг |

Геномная ДНК была выделена из 200 мкг образцов крови здоровых доноров (от  $4.0 \times 10^6$  клеток/мл до  $9.0 \times 10^6$  клеток/мл).

\*Для каждой пробирки средний выход определялся на 11 повторях

## 14. Процедура

### Важные пункты, которые необходимо учитывать перед началом процедуры

- После получения набора проверьте компоненты набора на наличие повреждений. Если упаковки или флаконы с буфером повреждены, свяжитесь со Службой технической поддержки QIAGEN или своим региональным дистрибьютором. В случае разлива жидкости см. пункт «Предупреждения и меры предосторожности». Не используйте поврежденные компоненты набора, поскольку их применение может снижать эффективность набора.
- Всегда меняйте наконечник дозатора между переносами жидкости. Для минимизации перекрестной контаминации мы рекомендуем использовать наконечники с аэрозольным барьером.
- Все этапы центрифугирования выполняйте при комнатной температуре (15-25°C).
- Всегда используйте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте их на контаминацию материалом образца. В случае загрязнения утилизируйте перчатки.
- Для минимизации перекрестной контаминации открывайте только по одной пробирке за раз.
- Не рекомендуется использовать компоненты из других наборов, однако при необходимости, компоненты можно использовать только в том случае, если номера партий наборов идентичны.
- Не допускайте микробную контаминацию реактивов из набора.
- Для минимизации риска инфицирования потенциально инфекционным материалом мы рекомендуем работать в проточном ламинарном шкафу до тех пор, пока образцы не пройдут лизис.
- Данный набор могут использовать только сотрудники, обученные лабораторным процедурам для диагностики in vitro.

### Подготовка реагентов и буферов

- Подготовка Протеиназы QIAGEN. Добавьте 1,2 мл растворителя Протеиназы (PS) во флакон с лиофилизированной Протеиназой QIAGEN (QP) и тщательно перемешайте. Во избежание пенообразования, перемешивайте, перевернув флакон несколько раз. Убедитесь, что Протеиназа QIAGEN (QP) полностью растворилась.

*Важно: Не добавляйте Протеиназу QIAGEN (QP) непосредственно в Буфер для лизиса (AL).*

- Приготовление Промывочного буфера 1. С помощью мерного цилиндра добавьте 25 мл этанола (96-100%) во флакон, содержащий 19 мл концентрата Промывочного буфера 1 (AW1). Храните восстановленный Промывочный буфер 1 (AW1) при комнатной температуре (15-25°C). Перед началом



процедуры всегда перемешивайте восстановленный Промывочный буфер 1 (AW1), переворачивая флакон несколько раз.

- Приготовление Промывочного буфера 2. С помощью мерного цилиндра добавьте 30 мл этанола (96-100%) во флакон, содержащий 13 мл концентрата Промывочного буфера 2 (AW2). Храните восстановленный Промывочный буфер 2 (AW2) при комнатной температуре (15-25°C).

*Важно: Перед началом процедуры всегда перемешивайте восстановленный Промывочный буфер 2 (AW2), переворачивая флакон несколько раз.*

- Приготовление Элюирующего буфера. В набор входит один флакон Элюирующего буфера (AE). Для предотвращения контаминации Элюирующего буфера (AE) настоятельно рекомендуется использовать наконечники дозаторов с аэрозольными барьерами для отбора буфера из флакона, а также рекомендуется закрывать крышку флакона сразу же после этого.

*ВАЖНО: Элюирующий буфер (AE) содержит консервант азид натрия, который имеет поглощающую способность при 260 нм. Следовательно, при количественном определении ДНК в элюате путем измерения оптической плотности при 260 нм и 280 нм, или при сканировании поглощающей способности в диапазоне между 220 нм и 350 нм, убедитесь, что образец сравнения содержит ту же концентрацию азиды натрия, что и элюат. Например, если Вы готовите элюат для измерения поглощающей способности разведением 50 мкл элюата водой в объеме 100 мкл, то подготовьте раствор сравнения разведением 50 мкл Элюирующего буфера (AE) водой в объеме 100 мкл. Для разведений используйте свежую дистиллированную воду.*

### **Работа с колонками QIAamp Mini**

Из-за чувствительности методов амплификации нуклеиновых кислот необходимы следующие меры предосторожности при работе с колонками QIAamp Mini во избежание перекрестной контаминации между образцами:

- Аккуратно наносите образец или раствор на колонку QIAamp Mini. Пипеткой поместите образец в колонку QIAamp Mini, не дотрагиваясь до края колонки.
- Всегда меняйте наконечники дозаторов между переносами жидкостей. Рекомендуется использовать наконечники с аэрозольным барьером.
- Не дотрагивайтесь до мембраны колонки QIAamp Mini наконечником пипетки.
- После выполнения всех этапов перемешивания кратко центрифугируйте пробирки для сбора капель с внутренней части крышек.
- Открывайте по одной колонке QIAamp Mini за раз, избегайте формирования аэрозолей.
- В течение всей процедуры используйте перчатки. В случае контакта между перчатками и образцом – незамедлительно смените перчатки.

### **Подготовка для вакуумной процедуры**

Убедитесь, что Вы корректно соединили колонку QIAamp Mini и коннектор VacConnector (VC) (см. Рисунок 3). Коннекторы VacConnectors VC по сути представляют собой одноразовые переходники, которые устанавливаются между центрифужными колонками QIAamp Mini и разъемами вакуумного коллектора. Коннекторы VacConnectors VC утилизируются после однократного использования.



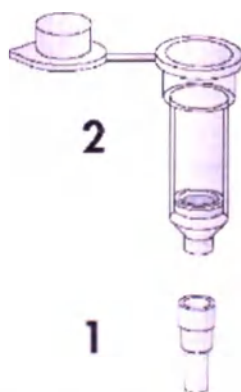


Рисунок 3. Компоненты набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit для вакуумной обработки образцов. 1 - коннектор VacConnector (VC), 2 – центрифужная колонка QIAamp Mini

#### 14.1. Протокол: Выделение геномной ДНК из образцов крови с использованием вакуума

Для выделения и очистки геномной ДНК из 200 мкл образцов цельной крови, обработанных ЭДТА, с использованием вакуума. Описанная ниже процедура содержит инструкции по обработке одного образца крови. Однако в зависимости от используемой вакуумной системы можно обрабатывать различное количество образцов одновременно.

##### Действия перед началом процедуры

- Довести образцы крови до комнатной температуры (15-25°C) и хорошо их перемешать.
- Если в Буфере для лизиса (AL) сформировался осадок, растворите его инкубированием при 56°C.
- Убедитесь, что Промывочный буфер 1 (AW1), Промывочный буфер 2 (AW2) и Протеиназа QIAGEN (QP) были подготовлены в соответствии с инструкциями, представленными в разделе «Приготовление реактивов и буферов».
- Выдержите Буфер для элюирования (AE) при комнатной температуре (15-25°C) для применения в этапе 14.
- Установите нагревательный блок на 56°C для применения на этапе 4.
- Процедуры контроля качества в компании QIAGEN предусматривают проведение функционального аттестационного испытания каждой отдельной партии наборов. Поэтому не совмещайте реактивы из различных партий наборов и не смешивайте отдельные реактивы из различных партий реактивов.

##### Процедура

1. С помощью дозатора добавьте 20 мкл Протеиназы QIAGEN (QP) в пробирку для лизиса (LT).  
*Примечание: Перед использованием проверьте срок годности разбавленной Протеазы.*
2. Добавьте 200 мкл образца крови в пробирку для лизиса (LT).
3. Добавьте 200 мкл Буфера для лизиса (AL) в пробирку для лизиса (LT), закройте крышку и перемешайте в вортексе в течение 15 секунд. Чтобы лизис прошел успешно важно, чтобы образец и Буфер для лизиса были тщательно перемешаны и получался однородный раствор.



*Примечание: Поскольку Буфер для лизиса (AL) имеет высокую вязкость, убедитесь, что отобран верный объем. Этого можно достичь медленным типетированием или использованием специального дозатора.*

*Примечание: Не добавляйте Протеиназу QIAGEN (QP) непосредственно в Буфер для лизиса (AL).*

4. Проинкубируйте при температуре 56°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) в течение 10 минут ( $\pm 1$  минута).
5. Центрифугируйте пробирку для лизиса (LT) в течение  $\geq 5$  секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.
6. Добавьте 200 мкл этанола (96-100%) в пробирку для лизиса (LT), закройте крышку и тщательно перемешайте в вортексе в течение  $\geq 15$  секунд.
7. Центрифугируйте пробирку для лизиса (LT) в течение  $\geq 5$  секунд на полной скорости, чтобы собрать капли с внутренней стороны крышки.
8. Подсоедините центрифужную колонку QIAamp Mini с коннектором VacConnector (VC) к вакуумной системе.
9. Аккуратно добавьте весь лизат из этапа 7 в центрифужную колонку QIAamp Mini, не дотрагиваясь до краев колонки. Избегайте контакта между мембраной колонки QIAamp Mini и наконечником дозатора.

*Примечание: При обработке нескольких образцов открывайте по одной пробирке для лизиса (LT) за раз.*

10. Включите вакуумный насос. После полного переноса лизата через мембрану колонки выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар.

*Примечание: Если по истечении 10 минут лизат не прошел полностью через мембрану, поместите колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT), закройте крышку и центрифугируйте при 6000 x g в течение 3 минут для полного прохождения лизата. Поместите колонку QIAamp Mini в другую чистую промывочную пробирку (WT) и продолжайте этап 10 протокола.*

*Примечание: Если лизат все же не проходит через мембрану во время центрифугирования, утилизируйте образец и повторите выделение и очистку с исходным материалом образца, начиная с этапа 1.*

11. Добавьте 750 мкл Промывочного буфера 1 (AW1) в центрифужную колонку QIAamp Mini, не дотрагиваясь до ее края. Избегайте контакта между мембраной колонки QIAamp Mini и наконечником дозатора. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После прохождения Промывочного буфера 1 (AW1) через колонку QIAamp Mini выключите вакуум и сбросьте давление до 0 бар.
12. Добавьте 750 мкл Промывочного буфера 2 (AW2) в колонку QIAamp Mini, не дотрагиваясь до ее края. Избегайте контакта между мембраной колонки QIAamp Mini и наконечником дозатора. Оставьте крышку колонки открытой и подайте вакуум. После прохождения Промывочного буфера 2 (AW2) через колонку QIAamp Mini сбросьте вакуум до 0 бар.
13. Закройте крышку колонки QIAamp Mini, отсоедините ее от вакуумной системы. Поместите колонку в чистую промывочную пробирку (WT) и центрифугируйте на полной скорости (приблизительно 20 000 x g или 14 000 rpm) в течение 3 минут, чтобы полностью высушить мембрану.

*Примечание: Не высушенная полностью мембрана может привести к ингибированию при дальнейших анализах.*

14. Поместите центрифужную колонку QIAamp Mini в чистую пробирку для элюирования (ET) и утилизируйте промывочную пробирку (WT), которая содержит фильтрат. Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp Mini и добавьте от 50 до 200 мкл Элюирующего буфера (AE) по центру мембраны. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре (15-25°C) в



течение 1 минуты. Центрифугируйте при 6000 x g в течение 1 минуты, чтобы элюировать ДНК.

#### **14.2. Протокол: Выделение геномной ДНК из образцов крови с использованием микроцентрифуги**

Для выделения и очистки геномной ДНК из 200 мкл образцов цельной крови, обработанных ЭДТА с использованием микроцентрифуги. Описанная ниже процедура содержит инструкции по обработке одного образца крови. При этом возможно обрабатывать несколько образцов одновременно, их количество зависит от вместимости используемой микроцентрифуги.

##### **Действия перед началом процедуры**

- Довести образцы крови до комнатной температуры (15-25°C) и хорошо их перемешать.
- Если в Буфере для лизиса (AL) сформировался осадок, растворите его инкубированием при 56°C.
- Убедитесь, что Промывочный буфер 1 (AW1), Промывочный буфер 2 (AW2) и Протеиназа QIAGEN (QP) были подготовлены в соответствии с инструкциями, представленными в разделе «Приготовление реактивов и буферов».
- Выдержите Буфер для элюирования (AE) при комнатной температуре (15-25°C) для применения на этапе 15.
- Установите нагревательный блок на 56°C для применения на этапе 4.
- Процедуры контроля качества в компании QIAGEN предусматривают проведение аттестационного испытания каждой отдельной партии наборов. Поэтому не совмещайте реактивы из различных партий наборов и не смешивайте отдельные реактивы из различных партий реактивов.

##### **Процедура**

1. С помощью дозатора добавьте 20мкл Протеиназы QIAGEN (QP) в пробирку для лизиса (LT).  
*Примечание: Перед использованием проверьте срок годности восстановленной Протеиназы QIAGEN.*
2. Добавьте 200мкл образца крови в пробирку для лизиса (LT).
3. Добавьте 200мкл Буфера для лизиса (AL) в пробирку для лизиса (LT), закройте крышку и перемешивайте в вортексе в течение 15 секунд. Чтобы лизис прошел успешно важно, чтобы образец и Буфер для лизиса были тщательно перемешаны и давали однородный раствор.  
*Примечание: Поскольку Буфер для лизиса (AL) имеет высокую вязкость, убедитесь, что вы отобрали верный объем. Этого можно достичь медленным пипетированием или использованием специального дозатора.*  
*Примечание: Не добавляйте Протеазу QIAGEN (QP) непосредственно в Буфер для лизиса (AL).*
4. Проинкубируйте при температуре 56°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) в течение 10 минут ( $\pm 1$  минута).
5. Центрифугируйте пробирку для лизиса (LT) в течение  $\geq 5$  секунд на полной скорости, чтобы удалить капли с внутренней стороны крышки.
6. Добавьте 200мкл этанола (96-100%) в пробирку для лизиса (LT), закройте крышку и тщательно перемешивайте в вортексе в течение  $\geq 15$  секунд.
7. Центрифугируйте пробирку для лизиса (LT) в течение  $\geq 5$  секунд на полной скорости, чтобы собрать капли с внутренней стороны крышки.
8. Аккуратно добавьте весь лизат из этапа 7 в центрифужную колонку QIAamp Mini, не смачивая края колонки. Избегайте контакта между мембраной колонки QIAamp Mini и наконечником пипетки.



*Примечание: При обработке нескольких образцов открывайте по одной пробирке для лизиса (LT) за раз.*

9. Закройте крышку колонки QIAamp Mini и центрифугируйте при приблизительно 6000 x g в течение 1 минуты. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT) и утилизируйте пробирку, содержащую фильтрат.

*Примечание: Если после центрифугирования при 6000 x g лизат прошел через мембрану не полностью, центрифугируйте снова на полной скорости (до 20000 x g) в течение 1 минуты.*

*Примечание: Если лизат все же не проходит через мембрану во время центрифугирования, утилизируйте образец и повторите выделение и очистку с новым материалом образца, начиная с этапа 1.*

10. Аккуратно откройте колонку QIAamp Mini и добавьте 500мкл Промывочного буфера 1 (AW1), не смачивая край колонки. Избегайте контакта между мембраной колонки QIAamp Mini и наконечником пипетки.
11. Закройте крышку колонки QIAamp Mini и центрифугируйте при приблизительно 6000 x g в течение 1 минуты. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую промывочную пробирку (WT) и утилизируйте пробирку, содержащую фильтрат.
12. Аккуратно откройте колонку и добавьте 500 мкл Промывочного буфера 2 (AW2), не смачивая край колонки. Избегайте контакта между мембраной колонки QIAamp Mini и наконечником пипетки.
13. Закройте крышку колонки QIAamp Mini и центрифугируйте на полной скорости (приблизительно 20000 x g) в течение 1 минуты. Поместите колонку в чистую промывочную пробирку (WT) и утилизируйте пробирку, содержащую фильтрат.
14. Центрифугируйте на полной скорости (приблизительно 20000 x g) в течение 3 минут, чтобы полностью высушить мембрану.  
*Примечание: Не высушенная полностью мембрана может привести к ингибированию при дальнейших анализах.*
15. Поместите колонку QIAamp Mini в чистую пробирку для элюирования (ET) и утилизируйте промывочную пробирку (WT), которая содержит фильтрат. Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp Mini и добавьте от 50 до 200 мкл Элюирующего буфера (AE) по центру мембраны. Закройте крышку и инкубируйте при комнатной температуре (15-25°C) в течение 1 минуты. Центрифугируйте при 6000 x g в течение 1 минуты, чтобы элюировать ДНК.

## **15. Контроль качества**

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit проходит испытание на соответствие установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

## **16. Эксплуатационные характеристики**

### **16.1. Выход очищенной ДНК**

Линейная область выхода ДНК при использовании набора для вакуумной процедуры была определена для здоровых доноров с количеством белых кровяных клеток от  $3,8 \times 10^6$  до  $1,34 \times 10^7$  клеток/мл (см. рис.4)



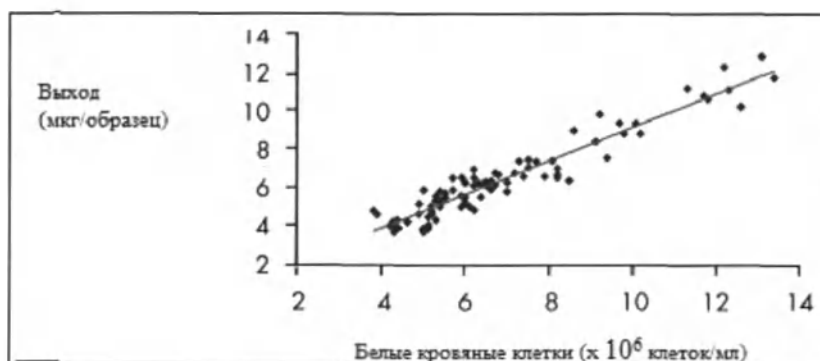


Рис.4. Линейный диапазон для выхода ДНК при использовании набора при вакуумной процедуре с 200 мкл объема элюирования.

### 16.2. Производительность в последующих анализах

Элюированная геномная ДНК готова к использованию в различных анализах, включая различные диагностические анализы *in vitro* (табл.2). Установлено отсутствие влияния объема элюирования и объема элюата, используемого в ПЦР, на эффективность анализа ПЦР (см. таблицу 3).

Таблица 2. Генотипирование фактора V Leiden (FV) с использованием ПЦР и пиросеквенирования с набором PSQ-96 SNP-Reagent Kit на PSQ 96MA

| Генотип                    | Number |
|----------------------------|--------|
| Дикий тип                  | 17     |
| FV G16191 A гетерозиготный | 13     |
| FV G16191 A гомозиготный   | 0      |

Цельная кровь была отобрана у 30 отдельных доноров, и геномная ДНК была выделена из 200 мкл цельной крови набором QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. Аллельный статус в локусе FV G1691 A определяли с помощью ПЦР и анализа пиросеквенирования с помощью набора PSQ-96 SNP-Reagent Kit на пиросеквенаторе PSQ 96MA (Biotage).

Таблица 3. Эффект объема элюирования на ПЦР реакции

| Объем элюирования | Объем элюата на 50 мкл ПЦР* |       |        |
|-------------------|-----------------------------|-------|--------|
|                   | 2 мкл                       | 5 мкл | 10 мкл |
| 50 мкл            | 100%                        | 100%  | 100%   |
| 100 мкл           | 100%                        | 100%  | 97%    |
| 200 мкл           | 100%                        | 100%  | 100%   |

\*Значения показывают успешные ПЦР и представляют среднее значение 48 образцов.

Набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit подходит для применения в сочетании с различными последующими диагностическими исследованиями *in vitro*. Геномную ДНК, выделенную и очищенную набором QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit, можно использовать для HLA-типирования, ПЦР и секвенирования

### 16.3. Исследуемый образец

Геномная ДНК, выделенная и очищенная из крови, собранной в различные пробирки для сбора крови, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта, отвечала всем критериям приемлемости к количеству и качеству полученной ДНК. Выход и

целостность геномной ДНК, выделенной и очищенной из образцов крови, собранных в пробирки, содержащие гепарин, были сопоставимы с результатами, полученными по образцам из крови, стабилизированной ЭДТА, однако, как ожидалось, гепарин, оставшийся в элюатах, приводил к ингибированию ПЦР. Набор рекомендован к использованию с образцами крови с ЭДТА в качестве антикоагулянта.

#### 16.4. Объем буфера для элюирования

Геномная ДНК выделялась и проходила очистку под вакуумом. Геномная ДНК отвечала всем критериям приемлемости к количеству и качеству и элюировалась в 50 мкл, 100 мкл и 200 мкл Элюирующего буфера АЕ. Даже при низком объеме элюирования 50 мкл и использовании 10 мкл элюата в ПЦР значительного ингибирования не наблюдалось. Следовательно, снижение элюирующего объема до 50мкл можно использовать для достижения более высоких концентраций геномной ДНК в элюатах, для применения в дальнейших диагностических процедурах in vitro диагностики.

#### 16.5. Сравнение центрифугирования и вакуумной процедуры

Набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit позволяет использовать вакуумный протокол и протокол центрифугирования для выделения и очистки геномной ДНК из 200 мкл цельной крови, поэтому было выполнено исследование для сравнения эффективности обоих протоколов. Количество и качество геномной ДНК, полученных при использовании обеих систем, эквивалентны.

#### 16.6. Прецизионность

Для анализа на восприимчивость к изменениям условий окружающей среды была проведена серия из 12 исследований с изменением таких переменных, как день испытания, оператор, оборудование и лаборатория.

Для оценки повторяемости, в одном из двенадцати исследований дополнительно один и тот же оператор выполнял по два эксперимента, используя одно и то же оборудование в один и тот же день.

Эти исследования подтвердили, что параметр «оператор» был единственным параметром, который влиял на эффективность набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit. В трех экспериментах, в которых все переменные (день испытания; оператор; оборудование; лаборатория) оставались без изменений, достоверных различий не наблюдалось, что указывало на хорошую воспроизводимость набора.

### 17.Маркировка

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие обозначения:

|                                                                                     |     |                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------|
|  | <N> | Содержит реагенты, достаточные для тестов <N> |
|  |     | Смотрите инструкции по применению             |
|  |     | Использовать до                               |
|  |     | Для диагностики In vitro                      |
|  |     | Каталожный номер                              |
|  |     | Номер партии                                  |
|  |     | Номер материала                               |
|  |     | Компоненты                                    |



|                                                                                     |                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|    | Объем                                                       |
|    | Диапазон температур                                         |
|    | Производитель                                               |
|    | По прибытии                                                 |
|    | Открыть при доставке; храните колонки QIAamp Mini при 2-8°C |
|    | Запишите текущую дату после добавления этанола во флакон    |
|    | Добавление                                                  |
|    | Содержит                                                    |
|    | Лиофилизированный                                           |
|    | Восстановить в                                              |
|    | Этанол                                                      |
|    | Гуанидин гидрохлорид                                        |
|   | Субтилизин                                                  |
|  | Номер                                                       |
|  | Глобальный торговый номер                                   |
|  | Внимание!                                                   |
| Rn                                                                                  | R - версия инструкции, а n - номер пересмотра               |
| →                                                                                   | Приводит к                                                  |

## 18.Требование к охране окружающей среды.

Медицинское изделие при использовании, транспортировке и хранении, не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду.

## 19. Утилизация

Чтобы избежать возможного загрязнения окружающей среды, изделие с истекшим сроком годности, отходы использованных реагентов, а также, в случае видимых повреждений индивидуальной упаковки, изделие должно утилизироваться местными публично-правовыми организациями, в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

На территории Российской Федерации набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit должен утилизироваться в соответствии с нормативными требованиями для отходов класса Б (как материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью или другими биологическими жидкостями) – после химических методов обеззараживания и аппаратных способов обеззараживания с применением физических методов в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21).

## 20. Контактная информация

Техническую поддержку и дополнительную информацию можно получить в центре технической поддержки по ссылке [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), позвонив по номеру 00800-22-44-6000, или обратившись в отдел технической поддержки QIAGEN или к местным дистрибьюторам (см. на сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## 21. Гарантийные обязательства

Компания QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ) принимает на себя гарантийные обязательства в отношении медицинского изделия по отсутствию дефектов и соответствию заявленным производителем характеристикам в течение всего срока годности, при соблюдении условий, указанных в инструкции по применению.

Производитель не несёт ответственности за повреждения или несчастные случаи в результате неправильного использования, ошибки пользователя или внешних чрезвычайных ситуаций. По вопросам качества продукции обращайтесь к уполномоченному представителю производителя.

## 22. Рекламации

**Производитель/разработчик медицинского изделия:**

QIAGEN GmbH / КАЙДЖЕН ГмбХ

Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany/ Кайджен Штрассе 1, 40724 Хильден, Германия

Номер телефона: +49-02103-29-0

Адрес электронной почты: [info@qiagen.com](mailto:info@qiagen.com);

Сайт: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Уполномоченный представитель производителя на территории Российской Федерации:**

Общество с ограниченной ответственностью "Кайджен РУС" (ООО "Кайджен РУС")

Россия, 123112, г. Москва, Пресненская набережная, дом 6, строение 2, этаж 50, помещение 5001

Номер телефона: +7 499 703 15 56

Адрес электронной почты: [qiagenrus@qiagen.com](mailto:qiagenrus@qiagen.com)

## 23. Редакция документа

| Дата            | Изменения                                                                                                                                  |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| R2, январь 2021 | Обновлен раздел Автоматизированный процесс выделения с использованием станции QIAcube,<br>Обновлены Предупреждения и Меры предосторожности |

## Приложение А: Автоматизированный процесс выделения с использованием станции QIAcube

Выделение и очистка нуклеиновых кислот с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit может быть полностью автоматизирована на оборудовании QIAcube. Инновационная автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот QIAcube использует современную технологию для обработки центрифужных колонок QIAamp Mini, обеспечивая непрерывную автоматизированную подготовку образцов. Подготовка образцов с использованием станции QIAcube включает те же этапы, что и ручная подготовка (лизис,



связывание, промывка и элюирование) и позволяет использовать набор QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit для высококачественного выделения нуклеиновых кислот.

При автоматической обработке образцов в станции QIAcube с использованием набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit может оказаться так, что прибор обработает менее 50 образцов крови из-за мертвых объемов, испарения и дополнительного потребления реагентов автоматическим дозатором. Компания QIAGEN гарантирует обработку 50 образцов только при ручном использовании набора QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.



Рисунок 5. Станция QIAcube

КАЙДЖЕН ГмбХ  
Кайджен штрассе 1  
40724 Хильден  
Германия

Номер по реестру 1739/2021 М

Настоящим подтверждаю, что подпись и печать на прилагаемом документе подтвердил в моем присутствии

г-н д-р Бартольд Пиэнинг, род. 19 ноября 1958 г.  
служебный адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,  
лично мне известный.

Г-н д-р Бартольд Пиэнинг действует не от своего имени, а от имени компании

**«КАЙДЖЕН ГмбХ»**  
(Адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,

После сверки с электронным торговым реестром Дюссельдорфа, запись под № HR В 45822 I, я удостоверяю, что

- в него внесена компания «КАЙДЖЕН ГмбХ» со штаб-квартирой в г. Хильден;
- в нем зарегистрирован г-н Бартольд Пиэнинг в качестве Управляющего директора, который всегда вправе представлять Компанию единолично по любому вопросу;
- Г-н д-р Бартольд Пиэнинг всегда освобожден от ограничений на заключение сделок с самим собой в соответствии с § 181 Гражданского кодекса Германии («ГК»).

Хильден, 11 августа 2021 года  
Д-р Никлас Майрозе  
Официальный нотариус  
Миттельштрассе 36-38, 40721, Хильден, Германия

[Круглая гербовая печать:  
Д-р Никлас Майрозе  
нотариус в Хильдене]

[Круглая гербовая печать:  
Д-р Никлас Майрозе  
нотариус в Хильдене]



Текст данного документа перевёл переводчик Сербигешева Ольга Анатольевна. Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является правильным, точным и полным.

Российская Федерация  
Город Москва

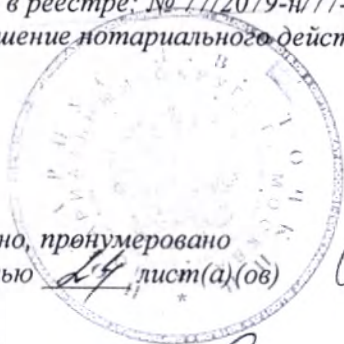
Двадцатого августа две тысячи двадцать первого года.

Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия Валерьевича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Сербигешевой Ольги Анатольевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

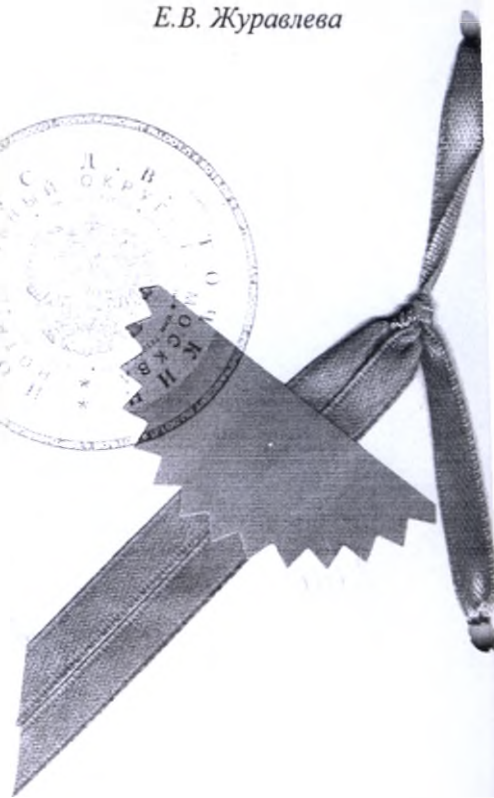
Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021- 11 1046  
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.



Е.В. Журавлева

Всего прошнуровано, пронумеровано  
и скреплено печатью 24 лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса



Российская Федерация

Город Москва

23 АВГ 2021

Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия Валерьевича, свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: N 77/2079-н/77- 2021-

Удостоверено за совершение нотариального действия: 1560

Е.В. Журавлева



*[Handwritten signature]*



Всего прошнуровано,  
пронумеровано и скреплено  
печатью 26

листов.

Нотариус

*[Handwritten signature]*



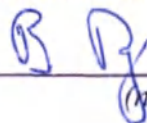


72  
**КОПИЯ**

«УТВЕРЖДАЮ» / “APPROVE”  
QIAGEN GmbH

Управляющий директор /Managing Director  
(должность/position)

Бартхолд Пиэнинг / Barthold Piening  
(имя/name)

  
(подпись/signature)

М.П. / Stamp  
QIAGEN GmbH  
QIAGEN Straße 1  
40724 Hilden  
Germany

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов

# Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit



50

Версия 1

IVD

Для диагностики in vitro



REF 61504



QIAGEN GmbH  
(КАЙДЖЕН ГмбХ)

Qiagen Str. 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)

R4 MAT 1118364



Deed Roll No.

**1742**

/ 2021 M

I hereby certify that signature on the document affixed and sealed hereto was authenticated before me by

Mr. Dr. Barthold Piening, born on 19. November 1958,  
business address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden,  
who is personally known to me.

Mr. Dr. Barthold Piening not acting in own matter, but on behalf of

**QIAGEN GmbH**

(Address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden).

Upon my inspection to the electronic Commercial register of Düsseldorf under HR B 45822 I hereby certify that:

- there the Company QIAGEN GmbH with headquarters in Hilden is listed;
- there Mr. Dr. Barthold Piening as Managing Director is registered and always empowered to represent the Company solely in each matter;
- Mr. Dr. Barthold Piening is always relieved from the restrictions on self-contracting according to § 181 of the German Civil Code ("BGB").

I could not inform myself about the content of the certified document because I do not master the language of the document. The notarization does not refer to the correctness of the document.

Hilden, 11 August 2021



Dr. Niklas Mairose

Notary public

Mittelstraße 36-38, 40721 Hilden, Germany





## Оглавление

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Наименование изделия .....                                                                     | 5  |
| 2. Производитель .....                                                                            | 5  |
| 3. Назначение, показания к применению, противопоказания. ....                                     | 5  |
| 4. Сведения о потенциальных потребителях .....                                                    | 6  |
| 5. Общие сведения .....                                                                           | 6  |
| 6. Принцип действия.....                                                                          | 6  |
| 7. Комплектность набора .....                                                                     | 8  |
| 8. Необходимые материалы, не входящие в комплект набора.....                                      | 9  |
| 9. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения ..... | 9  |
| 10. Предупреждения и меры предосторожности .....                                                  | 9  |
| 11. Срок годности.....                                                                            | 12 |
| 12. Хранение и перемещение реагентов .....                                                        | 12 |
| 13. Хранение и перемещение образцов.....                                                          | 12 |
| 14. Процедура .....                                                                               | 13 |
| 14.1. Краткий протокол: Выделение циркулирующих ДНК из 1-5 мл плазмы крови человека .....         | 15 |
| 14.2. Классический протокол: Выделение циркулирующих ДНК из 1-5 мл плазмы крови человека .....    | 18 |
| 15. Контроль качества.....                                                                        | 20 |
| 16. Эксплуатационные характеристики .....                                                         | 20 |
| 16.1. Исследуемый образец.....                                                                    | 20 |
| 16.2. Эквивалентность протоколов .....                                                            | 20 |
| 16.3. Кросс-контаминация.....                                                                     | 21 |
| 16.4. Объем буфера для элюирования .....                                                          | 21 |
| 16.5. Воспроизводимость .....                                                                     | 21 |
| 16.6. Интерферирующие вещества.....                                                               | 21 |
| 16.7. Выход ДНК.....                                                                              | 22 |
| 17. Маркировка.....                                                                               | 23 |
| 18. Требование к охране окружающей среды. ....                                                    | 24 |
| 19. Утилизация .....                                                                              | 24 |
| 20. Контактная информация.....                                                                    | 24 |
| 21. Гарантийные обязательства .....                                                               | 24 |
| 22. Рекламации .....                                                                              | 24 |
| 23. Ссылки.....                                                                                   | 25 |
| 24. Руководство по устранению неисправностей .....                                                | 25 |
| 25. Редакция документа.....                                                                       | 27 |
| Приложение 1: Рекомендации по получению и хранению плазмы крови .....                             | 27 |



## **КАЙДЖЕН, Технологии для отбора образцов и проведения анализов**

Компания QIAGEN — ведущий поставщик инновационных технологий отбора и анализа проб, позволяющих выделять и распознавать компоненты любых биологических образцов. Наши высокотехнологичные продукты и услуги отличаются высоким качеством и обеспечивают успех на всех этапах работы, от взятия образца до получения результата анализа.

QIAGEN задает стандарты в таких областях, как:

- Очистка ДНК, РНК и белков
- Анализ нуклеиновых кислот и белков
- Исследование микро-РНК и РНК-интерференции
- Автоматизация технологических процессов отбора и анализа проб

Наша миссия заключается в том, чтобы помогать вам добиваться выдающихся успехов и совершать прорывы. Более подробную информацию см. на веб-сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## 1. Наименование изделия

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения:

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit,

1. Центрифужные колонки QIAamp Mini с промывочными пробирками (2 мл) WT (50 шт.).
2. Удлинитель колонок (20 мл) EXT (2 x 25 шт.).
3. Промывочные пробирки (2 мл) WT (50 шт.).
4. Пробирки для элюирования (1,5 мл) ET (50 шт.).
5. Коннекторы VacConnectors VC (50 шт.).
6. Буфер для лизиса (220 мл) ACL (1 шт.).
7. Связывающий буфер (концентрат) (300 мл) ACB (1 шт.).
8. Промывочный буфер 1 (концентрат) (19 мл) ACW1 (1 шт.).
9. Промывочный буфер 2 (концентрат) (13 мл) ACW2 (1 шт.).
10. Элюирующий буфер (2 мл) AVE (5 шт.).
11. Протеиназа К (7 мл) PK (4 шт.).
12. Носитель РНК Carrier (310 мкг) (1 шт.).
13. Инструкция по применению.

## 2. Производитель

QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ)

Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)

Номера телефонов: +49-02103-29-0

Адрес электронной почты: [info@qiagen.com](mailto:info@qiagen.com);

Сайт: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

## 3. Назначение, показания к применению, противопоказания.

### Назначение

Для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов методом селективного связывания на мембране из диоксида кремния.

### Описание

Набор для выделения нуклеиновых кислот QIAamp DSP Circulating NA Kit (далее набор, набор реагентов, QIAamp DSP Circulating NA Kit) представляет собой систему, использующую технологию селективного связывания нуклеиновых кислот на мембране из диоксида кремния (QIAamp технология) для выделения и очистки циркулирующих, внеклеточных ДНК из образцов плазмы крови человека.

Набор QIAamp Circulating NA Kit - это готовое к использованию медицинское изделие для выделения и очистки ДНК из образцов плазмы, стабилизированной ЭДТА.

Набор рассчитан на обработку 50 образцов.

Время полного цикла анализа с использованием набора не превышает 90 минут.

### Показания к применению

Набор QIAamp Circulating NA Kit предназначен для выделения ДНК в качестве этапа пробоподготовки для последующего анализа очищенных нуклеиновых кислот в клинической лабораторной диагностике, в частности методом ПЦР.

Является преаналитическим методом, набор QIAamp Circulating NA Kit предназначен для подготовки образцов, но не для получения результатов исследований, качественных или количественных.

### Противопоказания к применению

При использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.



#### 4. Сведения о потенциальных потребителях

Набор должен использоваться только квалифицированным персоналом (лаборантами или врачами клинической лабораторной диагностики, владеющими методами молекулярно-биологических исследований для диагностики *in vitro*) в условиях профессиональной клинико-диагностической лаборатории. Пользователь также должен иметь навыки, необходимые для правильного выполнения исследований, описанных в данной инструкции по применению.

Медицинское изделие предназначено только для профессионального использования. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

#### 5. Общие сведения

Свободно-циркулирующие ДНК присутствуют в плазме крови в качестве коротких фрагментов <1000 bp, при этом их концентрация в плазме человека обычно низкая и варьируется в диапазоне от 1 до 100 нг/мл [1-5]. Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit позволяет эффективно выделять циркулирующие нуклеиновые кислоты из плазмы человека. Могут использоваться как свежие, так и замороженные образцы. При использовании Удлинитель колонок (EXT) и вакуумной процедуры можно обрабатывать образцы объемом до 5 мл, а вариативность объема элюирования от 20 до 150 мкл позволяет концентрировать нуклеиновые кислоты, присутствующие в низких количествах. Элюированная свободноциркулирующая ДНК готова к использованию в дальнейших реакциях (например, амплификации) или хранению. Набор позволяет эффективно удалять белки, нуклеазы и другие примеси.

#### 6. Принцип действия

Процедура выделения циркулирующих ДНК набором QIAamp DSP Circulating NA Kit включает 4 этапа (лизис, связывание, промывка и элюирование) и проводится с использованием центрифужных колонок QIAamp Mini и вакуумной системы. Процедура позволяет предотвратить перекрёстную контаминацию образцов и повысить безопасность пользователя во время работы с потенциально инфицированными образцами. В зависимости от используемого протокола, обработку могут проходить одновременно до 50 образцов менее чем за 2 часа. Принцип процедуры представлен на рис.1.



Рис.1. Процедура выделения набором QIAamp DSP Circulating NA Kit

### Объем образцов

Миниколонки QIAamp Mini связывают даже сильно фрагментированные нуклеиновые кислоты, которые короче чем 20 bp, при этом выход ДНК зависит от объема образца и концентрации циркулирующих нуклеиновых кислот (обычно 1-100 нг/мл в плазме). Процедура выделения набором QIAamp DSP Circulating NA Kit оптимизирована для образцов объемом до 5мл.

### Лизис образцов

Свободно-циркулирующие ДНК в биологических жидкостях обычно связаны с белками или обволакиваются везикулами, что требует эффективной стадии лизиса для высвобождения нуклеиновых кислот для их селективного связывания с мембраной колонки QIAamp Mini. Таким образом, образцы лизируются в сильно денатурирующих условиях при повышенных температурах в присутствии протеиназы К и буфера ACL, что обеспечивает инактивацию ДНКаз и высвобождение нуклеиновых кислот из связанных белков, липидов и везикул.

### Связывание с мембраной центрифужной колонки QIAamp Mini

Для оптимизации связывания циркулирующих ДНК с мембраной, для лизата используется буфер ACB. Лизаты затем переносятся на миниколонку QIAamp Mini и циркулирующие нуклеиновые кислоты адсорбируются мембраной из диоксида кремния при перемещении лизата под вакуумом. Солевой состав и уровень pH гарантируют, что большинство белков и других загрязнений, которые могут ингибировать ПЦР и последующие реакции, не удерживаются на мембране колонки QIAamp Mini.

### Удаление остаточных примесей



Нуклеиновые кислоты остаются связанными с мембраной, когда загрязнения эффективно удаляются в процессе трех этапов промывки.

#### Элюирование очищенных нуклеиновых кислот

Элюирование осуществляется с использованием буфера AVE при комнатной температуре. Объем элюирования может варьироваться от 50 до 150 мкл. Если требуются более высокие концентрации ДНК, объем элюирования необходимо снизить до 20 мкл. Объем элюирования менее чем 50 мкл ведет к повышению концентрации нуклеиновой кислоты в элюате, но и приводит к снижению общего выхода ДНК.

Элюированный объем может быть на 5 мкл меньше, чем объем добавленного в колонку буфера AVE.

#### Выход и размер нуклеиновых кислот

Выход свободноциркулирующих ДНК, выделенных из биологических образцов, обычно ниже 1 мкг, что трудно определяется спектрофотометрически. Кроме того, абсолютный выход циркулирующих ДНК, полученных из образца с применением набора, варьируется от образца к образцу и также зависит от других факторов (например, конкретной стадии заболевания). Для определения выхода ДНК рекомендуются количественные амплификационные методы.

Разброс по размерам циркулирующих нуклеиновых кислот, очищенных с использованием набора, может быть проверен электрофорезом на агарозном геле или гибридизацией со специфичными мечеными зондами [5].

#### Описание протоколов

В данной инструкции по применению содержатся два протокола.

«Краткий Протокол: Выделение циркулирующих нуклеиновых кислот из 1-5 мл плазмы крови человека», рассчитанный на объем до 5 мл плазмы с шагом 1 мл и оптимизированный для быстрого выполнения.

«Классический протокол: Выделение циркулирующих нуклеиновых кислот из 1-5 мл плазмы крови человека», рассчитанный на объем до 5 мл плазмы с шагом 1 мл и представляющий собой первоначально разработанную версию протокола для QIAamp DSP Circulating NA Kit.

## 7. Комплектность набора

### Состав набора

| Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit |                                                                     |                      |            |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|----------------------|------------|
| Каталожный номер                    |                                                                     |                      | 61504      |
| Количество реакций                  |                                                                     |                      | 50         |
| Обозначение                         | Описание                                                            | Идентификация        | Количество |
| QIAamp Mini                         | Центрифужные колонки QIAamp Mini с промывочными пробирками (2мл) WT | <b>COL</b>           | 50 шт      |
| EXT                                 | Удлинитель колонок (20мл) EXT                                       | <b>COL EXT</b>       | 2x25 шт    |
| WT                                  | Промывочные пробирки (2мл) WT                                       | <b>WASH TUBE</b>     | 50 шт      |
| ET                                  | Пробирки для элюирования (1,5мл) ET                                 | <b>ELU TUBE</b>      | 50 шт      |
| VC                                  | Коннекторы VacConnectors VC                                         | <b>VAC CON</b>       | 50 шт      |
| ACL                                 | Буфер для лизиса* (220мл) ACL                                       | <b>LYS BUF</b>       | 1 шт       |
| ACB                                 | Связывающий буфер* (концентрат) (300мл) ACB                         | <b>BIND BUF CONC</b> | 1 шт       |



|                          |                                                    |                 |       |
|--------------------------|----------------------------------------------------|-----------------|-------|
| ACW1                     | Промывочный буфер 1* (концентрат) (19мл) ACW1      | WASH BUF 1 CONC | 19 мл |
| ACW2                     | Промывочный буфер 2** (концентрат) (13мл) ACW2     | WASH BUF 2 CC   | 13 мл |
| AVE                      | Элюирующий буфер** (фиолетовые колпачки) (2мл) AVE | ELU BUF         | 5 шт  |
| PROTK                    | Протеиназа К (7мл) PK                              | PROTK           | 4 шт  |
| Carrier                  | Носитель РНК (красные колпачки) (310мкг) Carrier   | CAR RNA         | 1 шт  |
| Инструкция по применению |                                                    |                 | 1 шт  |

\* содержит хаотропные соли. См. раздел «Предупреждения и меры предосторожности»

\*\* содержит азид натрия в качестве консерванта

*Примечание: При работе с химикатами всегда надевайте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта или в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).*

## 8. Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- Этанол (96-100%)\*
- Изопропанол (100%)
- Пипетки (регулируемые) и наконечники для пипеток (во избежание перекрестного загрязнения рекомендуются наконечники для пипеток с аэрозольными барьерными фильтрами)
- Термомиксер или нагревательный блок\*\* для лизиса при 56°C, рассчитанный на 2мл промывочные пробирки
- Водяная баня или нагревательный блок, рассчитанный на 50мл центрифужные пробирки, с температурой от 56°C до 60°C\*
- Пробирки на 50 мл
- Вакуумный насос создающий вакуум от -800 до -900 мбар, (кат. № 84010, 84020 QIAGEN или аналог), Вакуумный коллектор (QIAvac 24 Plus кат.№ 19413 QIAGEN или аналог), опционально (на выбор): VacValves (кат. № 19408 QIAGEN) или аналог)
- Микроцентрифуга\*\* (с ротором на 2 мл пробирки)
- Измельченный лед (только для «Классического протокола»)
- Некоторые образцы могут потребовать разведения фосфатно буферным физиологическим раствором (PBS)
- Вортекс

\* не используйте денатурированный этанол, который содержит примеси метанола и метилэтилкетона

\*\* убедитесь, что инструменты проверены и откалиброваны согласно рекомендациям производителя

## 9. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения

Лекарственные средства, материалы человеческого и животного происхождения: не используются.

## 10. Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики in vitro

Правила техники безопасности



При работе с химикатами всегда используйте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки.

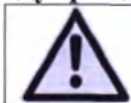
Для получения дополнительной информации ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности (SDS). Эти паспорта можно получить в компактном и удобном формате PDF на сайте [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), где можно найти, распечатать SDS каждого набора компании QIAGEN и каждого компонента в наборе. Утилизацию образцов и отходов после анализа следует проводить в соответствии с местными нормами безопасности.

#### Общие меры предосторожности

- Следует всегда обращать внимание на следующее:
- Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.
- Анализ следует проводить с образцами плазмы крови
- Следует допускать к работе только обученный персонал.
- Следует использовать одноразовые перчатки без талька талька, халат и защитные очки. Для получения дополнительной информации по безопасности можно обратиться к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые размещены в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).
- Запрещается использовать набор или компоненты с истекшим сроком годности и/или поврежденной упаковкой компонентов набора.
- Со всеми образцами следует обращаться как с потенциально биологически опасными веществами. Утилизацию образцов и отходов на различных стадиях обработки образца следует проводить в соответствии с местными/национальными правилами утилизации через уполномоченные организации в данном регионе.
- До, вовремя и после применения этого набора, все потенциально опасные материалы (то есть материалы, которые могли войти в контакт с клиническими образцами), включая пробирки, наконечники и прочие материалы, следует обрабатывать и утилизировать в соответствии с применимыми и соответствующими муниципальными / правилами, действующими в месте применения этого продукта.
- Не следует хранить открытыми флаконы с реагентами.
- Следует использовать калиброванные пипетки и инструменты.
- Следует использовать наконечники с фильтрами для пипеток
- Все поставляемые реагенты в наборах предназначены для использования только с другими реагентами из того же набора. Не следует заменять реагенты из набора на реагенты из других наборов, в том числе аналогичных, так как это может снизить эффективность работы.

*Примечание: Набор реагентов не содержит материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным*

#### Предупреждения



**ВНИМАНИЕ: не добавляйте отбеливатель или кислотные растворы непосредственно в отходы, содержащие буфер ACL, ACB и ACWI**

Буферы ACL, ACB и ACWI содержат гуанидингидрохлорид, который способен создавать высоко реакционноспособные вещества при соединении с отбеливателем.

В случае пролива жидкости, содержащей вышеперечисленные буферы, необходимо произвести очистку с использованием лабораторных детергентов и воды. Если разлитая жидкость потенциально инфицирована, сначала очистите зараженную зону лабораторным детергентом и водой, а затем 1 % раствором (объемного содержания) гипохлорита натрия.



В случае повреждения или протекания флаконов с буфером, наденьте перчатки и защитные очки во время утилизации флаконов, чтобы избежать вреда для своего здоровья и здоровья окружающих.

Компания QIAGEN не проводила испытаний жидких отходов, получаемых после выполнения процедур с использованием набора, на остаточные инфекционные материалы. Загрязнение жидких отходов остаточными инфекционными материалами маловероятно, но ее не стоит полностью исключать. Следовательно, жидкие отходы необходимо считать инфекционными, обрабатывать и утилизировать в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

К компонентам набора реагентов QIAamp DSP Circulating NA Kit применяются следующие коды риска и безопасности.

|                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Буфер ACB, ACL</b></p>   | <p>Содержит: гуанидин тиоцианат. Опасность! Вреден при проглатывании. Может быть вреден при контакте с кожей или при вдыхании. Вызывает сильные ожоги кожи и повреждения глаз. Вреден для водных организмов с длительными последствиями. При контакте с кислотами выделяется очень токсичный газ. Используйте защитные перчатки/ защитную одежду/ средства защиты глаз/ средства защиты лица. ПРИ ПОПАДАНИИ В ГЛАЗА: осторожно промыть водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если они есть, и это легко сделать. Продолжайте промывание. Немедленно обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу/ терапевту.</p> |
| <p><b>Буфер ACW1</b></p>                                                                                       | <p>Содержит гуанидин гидрохлорид. Может представлять опасность при попадании в пищеварительный тракт или дыхательные пути. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу в случае плохого самочувствия. Утилизируйте раствор/контейнер в специализированной установке, предназначенной для утилизации отходов. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз и лица.</p>                                                                                                                                                                            |
| <p><b>Протеиназа К</b></p>                                                                                    | <p>Содержит: Протеиназу К. Опасность! Вызывает легкое раздражение кожи. Может вызвать симптомы аллергии или астмы или затруднение дыхания при вдыхании. Избегайте вдыхания пыли/ дыма/ газа/ тумана/ паров/ брызг. Используйте защитные перчатки/ защитную одежду/ средства защиты глаз/ средства защиты лица. Используйте средства защиты органов дыхания. Если вы подверглись воздействию или появились симптомы: обратитесь в ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ЦЕНТР или к врачу/ терапевту. Обеспечьте доступ к свежему воздуху.</p>                                                                                                                  |

## Ограничения

Эффективность набора была определена при использовании плазмы крови для выделения свободно циркулирующей внеклеточной ДНК.

Для достижения оптимальных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению. Не рекомендуется разбавление реагентов, отличное от описанного в данной инструкции, которое приводит к потере производительности.

Следует обратить внимание на сроки годности и условия хранения, указанные на упаковке и этикетках всех компонентов. Не используйте просроченные или неправильно хранящиеся компоненты.

Для того, чтобы минимизировать риск неправильной интерпретации результатов последующей диагностики, необходимо использовать надлежащие контроли при последующих исследованиях.

Любые полученные диагностические результаты следует толковать вместе с другими клиническими или лабораторными данными.



## 11.Срок годности.

Срок годности набора QIAamp DSP Circulating NA Kit составляет 24 месяца. Изделие стабильно до истечения срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Условия хранения реагентов: при температуре 15-25°C,

Условия хранения центрифужных колонок QIAamp Mini - при температуре 2-8°C.

Условия транспортирования: при температуре от -20 до +45°C.

Если изделие предназначено только для периодического применения, после вскрытия флаконов, реагенты необходимо хранить при температуре 15-25°C не более 24 месяцев (до указанного срока годности).

После истечения срока годности изделие использовать запрещено.

## 12.Хранение и перемещение реагентов

Колонки QIAamp MinElute должны храниться при температуре 2-8°C после прибытия.

Все буферы могут храниться при комнатной температуре (15-25°C).

Лиофилизированный носитель РНК может храниться при комнатной температуре (15-25°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке. Носитель РНК может быть растворен только в буфере AVE; разбавленный носитель РНК должен сразу добавляться в буфер ACL. Данный раствор должен приготавливаться непосредственно перед использованием и остается стабильным при температуре 2-8°C до 48 часов. Разбавленный в буфере AVE носитель РНК может быть заморожен в аликвотах и храниться при температуре от -15 до -30°C до 24 месяцев.

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit содержит готовый для использования раствор Протеиназы К в специальном буфере для хранения. При условии хранения при комнатной температуре (15-25°C) Протеиназа К стабильна до даты окончания срока годности, указанной на этикетке набора.

Срок хранения Набора QIAamp DSP Circulating NA Kit после вскрытия – 24 месяцев (до истечения срока годности).

## 13.Хранение и перемещение образцов

### Подготовка и хранение образцов крови:

Во избежание фрагментации внеклеточной ДНК и высвобождения клеточных нуклеиновых кислот, рекомендуется хранить цельную кровь максимум 6 часов при температуре +2°C +8°C (например, с ЭДТА). При использовании пробирок для сбора крови, придерживайтесь условий хранения, указанных производителем.

### Подготовка и хранение плазмы:

Рекомендуется выполнять разделение плазмы и выделение нуклеиновых кислот немедленно после отбора пробы при использовании ЭДТА в качестве антикоагулянта. Кратковременно плазма может храниться до 24 часов при +2°C ... +8°C

Для длительного хранения аликвоты плазмы как из стабилизированных, так и нестабилизированных пробирок для сбора крови могут храниться при -20°C (в течении 3 недель) или -80°C (в течении 2 месяцев).

### Хранение элюированных нуклеиновых кислот:

Выделенные нуклеиновые кислоты собираются в 1,5 мл Пробирки для элюирования ЕТ (входят в состав набора). Очищенные циркулирующие ДНК должны храниться до 24 часов при температуре 2-8°C. Если период хранения превышает 24 часа, рекомендуемая температура хранения от -15 до -30°C для ДНК.



## 14. Процедура

### Важные пункты, которые необходимо учитывать перед началом процедуры

После получения набора проверьте компоненты набора на наличие повреждений. Если упаковки или флаконы с буфером повреждены, свяжитесь со Службой технической поддержки QIAGEN или своим региональным дистрибьютором. В случае разлива жидкости см. пункт «Предупреждения и меры предосторожности». Не используйте поврежденные компоненты набора, поскольку их применение может снижать эффективность набора.

Всегда меняйте наконечник дозатора между переносами жидкости. Для минимизации перекрестной контаминации мы рекомендуем использовать наконечники с аэрозольным барьером.

Все этапы центрифугирования выполняйте при комнатной температуре (15-25°C).

Всегда используйте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте их на контаминацию материалом образца. В случае загрязнения утилизируйте перчатки.

Для минимизации перекрестной контаминации открывайте только по одной пробирке за раз.

Не рекомендуется использовать компоненты из других наборов, однако при необходимости, компоненты можно использовать только в том случае, если номера партий наборов идентичны.

Не допускайте микробную контаминацию реактивов из набора.

Для минимизации риска инфицирования потенциально инфекционным материалом мы рекомендуем работать в проточном ламинарном шкафу до тех пор, пока образцы не пройдут лизис.

Данный набор могут использовать только сотрудники, обученные лабораторным процедурам для диагностики *in vitro*.

### Вакуумный коллектор

Вакуумный коллектор (QIAvac 24 Plus от QIAGEN или аналогичный) предназначен для быстрой и эффективной параллельной вакуумной обработки 24 колонок QIAamp Mini для очистки нуклеиновых кислот от примесей. Образцы и промывочные растворы проходят через мембраны колонок под вакуумом вместо центрифугирования, что обеспечивает большую скорость и снижает время операции по выделению.

*Примечание: Всегда соблюдайте осторожность и надевайте защитные очки во время работы возле вакуумного коллектора*

*Примечание: Для правильной работы необходимо, чтобы вакуумный насос мог создавать давление от 800 до 900 мбар. Избегайте более высокого вакуума. Использование вакуумного давления ниже рекомендованного может уменьшить выход ДНК и снизить ее чистоту.*

### Использование центрифужных колонок QIAamp Mini

Центрифужные колонки QIAamp Mini используются в вакуумном коллекторе через разъемы с одноразовыми Коннекторами VacConnectors VC. Это обеспечивает стабильный вакуум и ток жидкости, облегчая тем самым параллельную обработку различных объемов образцов. Коннекторы VacConnectors VC по сути представляют собой одноразовые переходники, которые устанавливаются между центрифужными колонками QIAamp Mini и разъемами вакуумного коллектора. Коннекторы VacConnectors VC утилизируются после однократного использования. Схема подключения колонок к вакуумному коллектору показана на рис.2. Из-за больших объемов используемого раствора следует использовать емкости для отходов фильтра, прошедшего через мембрану центрифужных колонок, который подлежит утилизации.



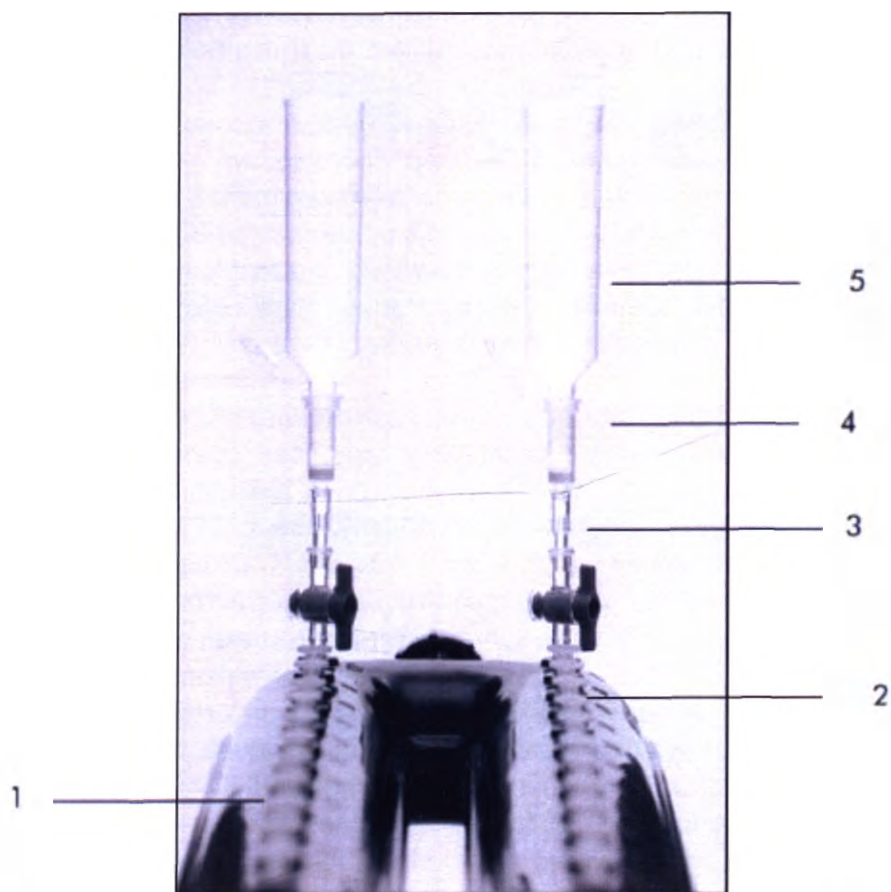


Рисунок 2. Вакуумный коллектор с центрифужными колонками QIAamp Mini.

1 - Вакуумный коллектор, 2 - Разъемы вакуумного коллектора (закрываются заглушками если не используются), 3 - Коннектор VacConnector VC, 4 - Центрифужная колонка QIAamp Mini, 5 - Удлинитель колонки EXT.

## Подготовка буферов и реагентов

### Буфер ACB

Перед использованием добавьте 200 мл изопропанола (100%) к 300 мл Связывающего буфера (концентрат) ACB для того, чтобы получить 500 мл готового буфера ACB. Хорошо перемешайте после добавления изопропанола.

### Буфер ACW1

Перед использованием добавьте 25 мл этанола (96–100%) в 19 мл Промывочного буфера (концентрат) ACW1 для того, чтобы получить 44 мл готового буфера ACW1. Хорошо перемешайте после добавления этанола.

### Буфер ACW2

Перед использованием добавьте 30 мл этанола (96–100%) в 13 мл Промывочного буфера (концентрат) ACW2 для того, чтобы получить 43 мл готового буфера ACW2. Хорошо перемешайте после добавления этанола.

### Добавление носителя РНК Carrier в буфер для лизиса ACL

Носитель РНК Carrier служит для двух целей. Во-первых, он усиливает связывание нуклеиновых кислот с мембраной колонки QIAamp Mini, что особенно важно, если в образце присутствует малое количество молекул. Во-вторых, добавление большого количества Носителя РНК Carrier уменьшает шанс распада нуклеиновых кислот в Буфере для лизиса ACL.

Количества лиофилизированного Носителя РНК Carrier в наборе достаточно для входящего в состав набора объема Буфера для лизиса ACL. Концентрация носителя РНК Carrier подобрана таким образом, что позволяет использовать протокол QIAamp DSP Circulating NA



Kit в качестве универсальной процедуры выделения нуклеиновых кислот, совместимой со многими различными системами амплификации и подходящей для широкого спектра мишеней ДНК.

Эффективность разных амплификационных систем варьируются в зависимости от общего количества нуклеиновой кислоты, которая присутствует в реакции. Элюаты, полученные при помощи данного набора, содержат и циркулирующие нуклеиновые кислоты, и Носитель РНК Carrier. В большинстве случаев количество носителя РНК будет в значительной степени превышать количество циркулирующих нуклеиновых кислот в образце. Поэтому количественный анализ выделенных циркулирующих ДНК методом УФ-спектрометрии не будет достоверным, так как результаты таких измерений будут определяться и присутствием добавленного носителя.

Для амплификационных систем, использующих олигонуклеотидные (dT) праймеры, во время выделения свободно-циркулирующих нуклеиновых кислот носитель РНК Carrier добавляться не должен.

Добавьте 1550 мкл Элюирующего буфера AVE\* в пробирку, содержащую 310 мкг лиофилизированного Носителя РНК Carrier чтобы получить раствор концентрацией в 0,2 мкг/мкл. Тщательно растворите содержимое, разделите его на аликвоты необходимого объема и храните при температуре от -15 до -30°C, при этом не допускается более трех циклов замораживания/размораживания аликвот.

Следует отметить, что Носитель РНК Carrier не растворяется напрямую в Буфере для лизиса ACL. Сначала его необходимо растворить в Элюирующем буфере AVE, а затем добавлять буфер ACL. Выберите количество образцов, которые должны обрабатываться одновременно и рассчитайте объем смеси Буфер для лизиса ACL - Носитель РНК Carrier, необходимый для данной партии образцов, в соответствии с таблицами, указанными в протоколах ниже. Перед работой аккуратно перемешайте смесь, переворачивая пробирку 10 раз. Не используйте вортекс.

*Примечание: Процедура подготовки образцов оптимизирована для 1,0 мкг Носителя РНК Carrier на один образец. Если для вашей амплификационной системы лучше использовать меньшее количество, уменьшите объем растворенного носителя, добавляемого в буфер ACL.*

#### **14.1. Краткий протокол: Выделение циркулирующих ДНК из 1-5 мл плазмы крови человека**

Данный протокол для выделения и очистки циркулирующей ДНК из 1-5 мл плазмы крови человека и оптимизирован для оперативной и не требующей ручной работы процесса. Для выверенных и отработанных пользователем процессов можно использовать раннюю версию протокола (см. подраздел «Классический протокол: Выделение циркулирующих ДНК из 1-5 мл плазмы крови человека»)

##### **Важные моменты перед началом работы:**

- Все стадии центрифугирования проводятся при комнатной температуре (15-25 C)
- Сбрасывайте вакуум между этапами процедуры для того, чтобы обеспечить равномерный вакуум во время обработки образцов.
- Вакуумное давление должно быть от -800 до -900мБар
- Доведите температуру образцов до комнатной.
- С помощью фосфатно-буферного физиологического раствора доведите объем образца до ближайшего кратного значения от 1 до 5мл.
- Подогрейте водяную баню или нагревательный блок до температуры 60°C для использования с 50мл центрифужными пробирками на этапе 3
- Подогрейте нагревательный блок до температуры 56°C для использования с 2мл промывочными пробирками на этапе 14



- Выдержите центрифужные колонки QIAamp Mini по меньшей мере 1 час при комнатной температуре.
- Убедитесь в том, что Связывающий буфер ACB, Промывочный буфер ACW1 и ACW2 были предварительно подготовлены (см. подраздел «Подготовка буферов и реагентов»).
- Добавьте Носитель РНК Carrier, разбавленный в Элюирующем буфере AVE в Буфер для лизиса ACL в соответствии с инструкциями в таблице 1.

Таблица 1. Объем буфера для лизиса ACL и носителя РНК Carrier (растворенного в буфере AVE), необходимый для анализа 1-5 мл плазмы крови человека

| Объем плазмы        | A                         | B    | C    | D    | E     | Носитель РНК Carrier в буфере AVE (мкл) |
|---------------------|---------------------------|------|------|------|-------|-----------------------------------------|
|                     | 1 ml                      | 2 ml | 3ml  | 4 ml | 5 ml  |                                         |
| Количество образцов | Буфер для лизиса ACL (мл) |      |      |      |       |                                         |
| 1                   | 0,9                       | 1,8  | 2,6  | 3,5  | 4,4   | 5,6                                     |
| 2                   | 1,8                       | 3,5  | 5,3  | 7,0  | 8,8   | 11,3                                    |
| 3                   | 2,6                       | 5,3  | 7,9  | 10,6 | 13,2  | 16,9                                    |
| 4                   | 3,5                       | 7,0  | 10,6 | 14,1 | 17,6  | 22,5                                    |
| 5                   | 4,4                       | 8,8  | 13,2 | 17,6 | 22,0  | 28,1                                    |
| 6                   | 5,3                       | 10,6 | 15,8 | 21,1 | 26,4  | 33,8                                    |
| 7                   | 6,2                       | 12,3 | 18,5 | 24,6 | 30,8  | 39,4                                    |
| 8                   | 7,0                       | 14,1 | 21,1 | 28,2 | 35,2  | 45,0                                    |
| 9                   | 7,9                       | 15,8 | 23,8 | 31,7 | 39,6  | 50,6                                    |
| 10                  | 8,8                       | 17,6 | 26,4 | 35,2 | 44,0  | 56,3                                    |
| 11                  | 9,7                       | 19,4 | 29,0 | 38,7 | 48,4  | 61,9                                    |
| 12                  | 10,6                      | 21,1 | 31,7 | 42,2 | 52,8  | 67,5                                    |
| 13                  | 11,4                      | 22,9 | 34,3 | 45,8 | 57,2  | 73,1                                    |
| 14                  | 12,3                      | 24,6 | 37,0 | 49,3 | 61,6  | 78,8                                    |
| 15                  | 13,2                      | 26,4 | 39,6 | 52,8 | 66,0  | 84,4                                    |
| 16                  | 14,1                      | 28,2 | 42,2 | 56,3 | 70,4  | 90,0                                    |
| 17                  | 15,0                      | 29,9 | 44,9 | 59,8 | 74,8  | 95,6                                    |
| 18                  | 15,8                      | 31,7 | 47,5 | 63,4 | 79,2  | 101,3                                   |
| 19                  | 16,7                      | 33,4 | 50,2 | 66,9 | 83,6  | 106,9                                   |
| 20                  | 17,6                      | 35,2 | 52,8 | 70,4 | 88,0  | 112,5                                   |
| 21                  | 18,5                      | 37,0 | 55,4 | 73,9 | 92,4  | 118,1                                   |
| 22                  | 19,4                      | 38,7 | 58,1 | 77,4 | 96,8  | 123,8                                   |
| 23                  | 20,2                      | 40,5 | 60,7 | 81,0 | 101,2 | 129,4                                   |
| 24                  | 21,1                      | 42,2 | 63,4 | 84,5 | 105,6 | 135,0                                   |

#### Процедура: Краткий протокол

1. С помощью пипетки перенесите Протеиназу К, образец плазмы и буфер для лизиса ACL в соответствующих пропорциях в 50 мл пробирку для центрифуги (не входит в комплект).

|                    | A   | B   | C   | D   | E   |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Протеиназа К (мкл) | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Плазма (мл)        | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
| Буфер ACL (мл)     | 0,8 | 1,6 | 2,4 | 3,2 | 4,0 |

2. Закройте крышкой и перемешайте в вортексе в течение 30 секунд

Убедитесь в том, что содержимое хорошо перемешалось в пробирке. Для того, чтобы обеспечить надлежащий лизис, необходимо, чтобы буфер ACL и образец хорошо перемешались и представляли собой однородный раствор.



*Примечание: Не прерывайте процедуру на данном этапе. Сразу перейдите к этапу 3 для того, чтобы начать инкубацию.*

3. Проинкубируйте при температуре 56°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) в течение 15 ( $\pm 1$ ) минут.
4. Поставьте пробирку на лабораторный стол и откройте крышку.
5. Добавьте приготовленный буфер ACB в лизат, находящийся в пробирке. Выберите объем, соответствующий стадии 1.

|                | A   | B   | C   | D   | E   |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Буфер ACB (мл) | 1,8 | 3,6 | 5,4 | 7,2 | 9,0 |

6. Закройте крышку и тщательно перемешайте в вортексе 5 x 2 секунды. Убедитесь в том, что содержимое хорошо перемешалось в пробирке. Для того, чтобы обеспечить надлежащий лизис, необходимо, чтобы буфер ACB и образец хорошо перемешались и представляли собой однородный раствор.
7. Проинкубируйте смесь лизата и буфера ACB в пробирке в течение 5 ( $\pm 1$ ) минут при комнатной температуре.
8. Поместите центрифужную колонку QIAamp Mini в коннектор VacConnector, размещенный на вакуумном коллекторе (см. подраздел «Использование центрифужных колонок QIAamp Mini»). Вставьте 20 мл удлинитель колонки в открытую колонку QIAamp Mini. Убедитесь, что удлинитель колонки надежно закреплен, чтобы предотвратить утечку образца.
9. Аккуратно переместите лизат, полученный на этапе 7, в удлинитель колонки QIAamp Mini. Включите вакуумный насос. После полного переноса лизатов через колонки выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар. Аккуратно снимите и утилизируйте удлинитель колонки. Необходимо отметить, что для большого объема лизата (около 18 мл со стартовых 5 мл образца) может потребоваться до 20 минут чтобы лизат полностью прошел через мембрану центрифужной колонки QIAamp Mini.

*Примечание: во избежание кросс-контаминации, соседние колонки QIAamp Mini не должны соприкасаться между собой.*

10. Добавьте 600 мкл приготовленного буфера ACW1 в центрифужную колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как буфер ACW1 полностью пройдет через мембрану колонки, отключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар.
11. Добавьте 750 мкл приготовленного буфера ACW2 в центрифужную колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как буфер ACW 2 полностью пройдет через мембрану колонки, отключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар.
12. Добавьте 750 мкл этанола (96-100%) в центрифужную колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как этанол полностью переместится через колонку, отключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар.
13. Закройте крышку центрифужной колонки QIAamp Mini. Снимите колонку с вакуумного коллектора и утилизируйте коннектор VacConnector. Поместите колонку в чистую 2 мл промывочную пробирку и центрифугируйте на полной скорости (20000 x g; 14,000 rpm) в течение 3 ( $\pm 0,5$ ) минут.
14. Поместите центрифужную колонку QIAamp Mini в новую 2 мл промывочную пробирку. Откройте крышку и проинкубируйте при комнатной температуре в течении 3 минут для того, чтобы полностью высушить мембрану.
15. Поместите центрифужную колонку QIAamp Mini в чистую 1,5 мл пробирку для элюирования ET (входит в состав набора) и утилизируйте 2 мл промывочную пробирку, использованную на этапе 14. Аккуратно добавьте 20-150 мкл элюирующего буфера AVE по центру мембраны колонки QIAamp Mini. Закройте крышку и проинкубируйте при комнатной температуре в течение 3 ( $\pm 0,5$ ) минут.



*Важно: убедитесь в том, что температура элюирующего буфера AVE соответствует комнатной температуре (15-25°C). Если элюирование осуществляется в небольших объемах (<50 мкл), элюирующий буфер должен наноситься по центру мембраны для лучшего вымывания связанных нуклеиновых кислот. Объем элюирования варьируется в зависимости от требований испытания. Объем элюата будет приблизительно на 5 мкл меньше элюирующего объема.*

16. Центрифугируйте в микроцентрифуге при полной скорости (20000 x g) в течение 1 минуты для вымывания нуклеиновых кислот.

#### 14.2. Классический протокол: Выделение циркулирующих ДНК из 1-5 мл плазмы крови человека

Данный протокол представлен в ранней версии инструкции по применению QIAamp DSP circulating NA Kit для использования, и может использоваться например, с существующими выверенными пользователями рабочими процессами для 1-5 мл плазмы крови человека.

##### Важные моменты перед началом работы:

- Все стадии центрифугирования проводятся при комнатной температуре (15-25°C)
- Сбрасывайте вакуум между этапами процедуры для того, чтобы обеспечить равномерный вакуум во время обработки образцов.
- Вакуумное давление должно быть от -800 до -900мБар
- Доведите температуру образцов до комнатной.
- С помощью фосфатно-буферного физиологического раствора доведите объем образца до ближайшего кратного значения от 1 до 5мл.
- Подогрейте водяную баню или нагревательный блок до температуры 60°C для использования с 50мл центрифужными пробирками на этапе 3
- Подогрейте нагревательный блок до температуры 56°C для использования с 2мл промывочными пробирками на стадии 14
- Выдержите центрифужные колонки QIAamp Mini по меньшей мере 1 час при комнатной температуре.
- Убедитесь в том, что Связывающий буфер ACB, Промывочный буфер ACW1 и ACW2 были предварительно подготовлены (см. подраздел «Подготовка буферов и реагентов»).
- Добавьте Носитель РНК Carriер, разбавленный в Элюирующем буфере AVE в Буфер для лизиса ACL в соответствии с инструкциями в таблице 2.

Таблица 2. Объем буфера для лизиса ACL и носителя РНК Carriер (растворенного в буфере AVE), необходимый для анализа 1-5 мл плазмы крови человека

| Объем плазмы        | A              | B    | C    | D    | E    | Носитель РНК Carriер в буфере AVE (мкл) |
|---------------------|----------------|------|------|------|------|-----------------------------------------|
|                     | 1 мл           | 2 мл | 3 мл | 4 мл | 5 мл |                                         |
| Количество образцов | Буфер ACL (мл) |      |      |      |      |                                         |
| 1                   | 0,9            | 1,8  | 2,6  | 3,5  | 4,4  | 5,6                                     |
| 2                   | 1,8            | 3,5  | 5,3  | 7,0  | 8,8  | 11,3                                    |
| 3                   | 2,6            | 5,3  | 7,9  | 10,6 | 13,2 | 16,9                                    |
| 4                   | 3,5            | 7,0  | 10,6 | 14,1 | 17,6 | 22,5                                    |
| 5                   | 4,4            | 8,8  | 13,2 | 17,6 | 22,0 | 28,1                                    |
| 6                   | 5,3            | 10,6 | 15,8 | 21,1 | 26,4 | 33,8                                    |
| 7                   | 6,2            | 12,3 | 18,5 | 24,6 | 30,8 | 39,4                                    |
| 8                   | 7,0            | 14,1 | 21,1 | 28,2 | 35,2 | 45,0                                    |
| 9                   | 7,9            | 15,8 | 23,8 | 31,7 | 39,6 | 50,6                                    |
| 10                  | 8,8            | 17,6 | 26,4 | 35,2 | 44,0 | 56,3                                    |

|    |      |      |      |      |       |       |
|----|------|------|------|------|-------|-------|
| 11 | 9,7  | 19,4 | 29,0 | 38,7 | 48,4  | 61,9  |
| 12 | 10,6 | 21,1 | 31,7 | 42,2 | 52,8  | 67,5  |
| 13 | 11,4 | 22,9 | 34,3 | 45,8 | 57,2  | 73,1  |
| 14 | 12,3 | 24,6 | 37,0 | 49,3 | 61,6  | 78,8  |
| 15 | 13,2 | 26,4 | 39,6 | 52,8 | 66,0  | 84,4  |
| 16 | 14,1 | 28,2 | 42,2 | 56,3 | 70,4  | 90,0  |
| 17 | 15,0 | 29,9 | 44,9 | 59,8 | 74,8  | 95,6  |
| 18 | 15,8 | 31,7 | 47,5 | 63,4 | 79,2  | 101,3 |
| 19 | 16,7 | 33,4 | 50,2 | 66,9 | 83,6  | 106,9 |
| 20 | 17,6 | 35,2 | 52,8 | 70,4 | 88,0  | 112,5 |
| 21 | 18,5 | 37,0 | 55,4 | 73,9 | 92,4  | 118,1 |
| 22 | 19,4 | 38,7 | 58,1 | 77,4 | 96,8  | 123,8 |
| 23 | 20,2 | 40,5 | 60,7 | 81,0 | 101,2 | 129,4 |
| 24 | 21,1 | 42,2 | 63,4 | 84,5 | 105,6 | 135,0 |

### Процедура: Классический протокол

1. С помощью пипетки добавьте Протеиназу К, образец плазмы и буфер для лизиса ACL в соответствующих пропорциях в 50 мл пробирку для центрифуги (не входит в комплект).

|                    | A   | B   | C   | D   | E   |
|--------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Протеиназа К (мкл) | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Плазма (мл)        | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   |
| Буфер ACL (мл)     | 0,8 | 1,6 | 2,4 | 3,2 | 4,0 |

2. Закройте крышкой и перемешайте в вортексе в течение 30 секунд

Убедитесь в том, что содержимое хорошо перемешалось в пробирке. Для того, чтобы обеспечить надлежащий лизис, необходимо, чтобы буфер для лизиса ACL и образец хорошо перемешались и представляли собой однородный раствор.

*Примечание: Не прерывайте процедуру. Сразу перейдите к этапу 3 для того, чтобы начать инкубацию.*

3. Проинкубируйте при температуре 60°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) в течение 30 ( $\pm 2$ ) минут.

4. Поставьте пробирку на лабораторный стол и откройте крышку.

6. Добавьте приготовленный буфер ACB в лизат, находящийся в пробирке. Выберите объем, соответствующий стадии 1.

|                | A   | B   | C   | D   | E   |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Буфер ACB (мл) | 1,8 | 3,6 | 5,4 | 7,2 | 9,0 |

6. Закройте крышку и тщательно перемешайте в вортексе в течение 30 секунд. Убедитесь в том, что содержимое хорошо перемешалось в пробирке. Для того, чтобы обеспечить надлежащий лизис, необходимо, чтобы буфер ACB и образец хорошо перемешались и представляли собой однородный раствор.

7. Проинкубируйте смесь лизата и буфера ACB в пробирке в течение 5 ( $\pm 1$ ) минут на льду.

8. Поместите центрифужную колонку QIAamp Mini в коннектор VacConnector на вакуумном коллекторе (см. подраздел «Использование центрифужных колонок QIAamp Mini»). Вставьте 20 мл удлинитель колонки в открытую колонку QIAamp Mini. Убедитесь, что удлинитель колонки надежно закреплен, чтобы предотвратить утечку образца.

9. Аккуратно переместите лизат, полученный на этапе 7, в удлинитель колонки QIAamp Mini. Включите вакуумный насос с вакуумным давлением от -800 до -900 мбар. После полного переноса лизатов через колонки выключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар. Аккуратно снимите и утилизируйте удлинитель колонки.

Необходимо отметить, что для большого объема лизата (около 18мл со стартовых 5мл образца) может потребоваться до 20 минут чтобы лизат полностью прошел через мембрану центрифужной колонки QIAamp Mini.



*Примечание: для того, чтобы избежать кросс-контаминации, соседние колонки QIAamp Mini не должны соприкасаться между собой.*

10. Добавьте 600 мкл приготовленного буфера ACW1 в центрифужную колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как буфер ACW1 полностью пройдет через мембрану колонки, отключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар.

11. Добавьте 750 мкл приготовленного буфера ACW2 в центрифужную колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как буфер ACW 2 полностью переместится через мембрану колонки, отключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар.

12. Добавьте 750 мкл этанола (96-100%) в центрифужную колонку QIAamp Mini. Оставьте крышку колонки открытой и включите вакуумный насос. После того, как этанол полностью пройдет через мембрану колонки, отключите вакуумный насос и сбросьте давление до 0 бар.

13. Закройте крышку центрифужной колонки QIAamp Mini. Снимите колонку с вакуумного коллектора и утилизируйте коннектор VacConnector. Поместите колонку в чистую 2 мл промывочную пробирку WT и центрифугируйте на полной скорости (20000 x g; 14,000 rpm) в течение 3 ( $\pm 0,5$ ) минут.

14. Поместите центрифужную колонку QIAamp Mini в новую 2 мл промывочную пробирку WT. Откройте крышку и проинкубируйте при температуре 56°C в течение 10 ( $\pm 1$ ) минут для того, чтобы полностью высушить мембрану.

15. Поместите центрифужную колонку QIAamp Mini в чистую 1,5 мл пробирку для элюирования ET (входит в состав набора) и утилизируйте 2 мл промывочную пробирку, использованную на этапе 13. Аккуратно добавьте 20-150 мкл элюирующего буфера AVE по центру мембраны колонки QIAamp Mini. Закройте крышку и проинкубируйте при комнатной температуре в течение 3 ( $\pm 0,5$ ) минут.

*Важно: убедитесь в том, что температура элюирующего буфера AVE соответствует комнатной температуре (15-25°C). Если элюирование осуществляется в небольших объемах (<50 мкл), элюирующий буфер должен наноситься по центру мембраны для полного вымывания связанных нуклеиновых кислот. Объем элюирования варьируется в соответствии с требованиями испытаний. Объем элюата будет приблизительно на 5 мкл меньше элюирующего объема.*

16. Центрифугируйте в микроцентрифуге при полной скорости (20000 x g; 14,000 rpm) в течение 1 минуты для того, чтобы элюировать нуклеиновые кислоты.

## **15. Контроль качества**

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия набора QIAamp DSP Circulating NA Kit проходит испытание на соответствие установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

## **16. Эксплуатационные характеристики**

### **16.1. Исследуемый образец**

Циркулирующие внеклеточные нуклеиновые кислоты, выделенные и очищенные из крови, собранной в различные пробирки, содержащие ЭДТА в качестве антикоагулянта, отвечали всем критериям приемлемости к количеству и качеству полученной ДНК. На основании данных исследования были выработаны рекомендации по сбору и хранению образцов (см. раздел «Хранение и перемещение образцов», а также Приложение 1).

### **16.2. Эквивалентность протоколов**

Целью исследования было подтвердить эквивалентность протоколов выделения – «краткий» протокол, внесенный в редакцию 3 инструкции по применению и «классический» протокол, который использовался ранее. Точность определялась ПЦР в реальном времени для



cfДНК (18S, 66bp). Критерием приемлимости являлось, что соответствующий 95%-ный доверительный интервал разницы в средних копиях/мл между «кратким» протоколом и «классическим» протоколом должен быть в пределах  $\pm 2 \times \text{STD}$ , что является стандартным отклонением наблюдаемой точности классического протокола для плазмы (эталонное условие).

Критерии приемлимости были выполнены. Среднее число копий/мл «краткого» протокола по плазме (34283/1 мл; 26753/5 мл) находится в пределах  $\pm 2 \times \text{STD}$  (9992/1 мл; 2357/5 мл), что является стандартным отклонением наблюдаемой точности «классического» протокола по плазме (контрольное условие, среднее 32255/1 мл; 26778/5 мл).

### 16.3. Кросс-контаминация

Целью этого теста было проверить, что набор QIAamp DSP Circulation NA Kit способен обрабатывать положительные образцы рядом с отрицательными и в процессе этапов выделения не наблюдается перекрестное загрязнение.

В рамках верификации набора Therascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit было проведено исследование кросс-контаминации. Это исследование было сосредоточено на выделении ДНК из положительных образцов с мутацией и образцов плазмы дикого типа с использованием набора QIAamp DSP Circulating NA Kit и последующим ПЦР анализом на мутации выделенной ДНК с использованием набора Therascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit.

Все положительные образцы были определены как положительные. Никакого перекрестного загрязнения не наблюдалось. Критерии приемлимости были соблюдены.

### 16.4. Объем буфера для элюирования

Циркулирующие внеклеточные ДНК, выделенные и очищенные набором QIAamp DSP Circulating NA Kit, отвечали всем критериям приемлемости к количеству и качеству при вымывании с мембраны центрифужных колонок с использованием 20 мкл, 50 мкл и 150 мкл элюирующего буфера AVE. Даже при низком объеме элюирования 20 мкл и использовании 10 мкл элюата в дальнейших исследованиях статистически значимых различий не наблюдалось. Следовательно, снижение элюирующего объема до 20 мкл можно использовать для достижения более высоких концентраций внеклеточных ДНК в элюатах, для применения в дальнейших диагностических процедурах *in vitro* диагностики.

### 16.5. Воспроизводимость

Целью этого теста было проверить, что набор QIAamp DSP Circulation NA Kit способен одинаково обрабатывать образцы в рамках одного цикла выделения (повторяемость) и в разных циклах выделения при использовании разных партий набора QIAamp DSP Circulation NA Kit (вариабельность от партии к партии). Общая точность (STD) Log10 копий на мл для внутрилотовой (повторяемость) и межлотовой воспроизводимости составила  $\leq 0,086$  для каждого процесса выделения, а % CV составил 0,7% и 3,7% копий/мл соответственно.

Кроме того, была проверена эффективность обработки образцов в разные дни с разными операторами и оборудованием (промежуточная точность). Результаты показали, что параметр «оператор» был единственным параметром, который влиял на эффективность выделения набором QIAamp DSP Circulating NA Kit. В тех экспериментах, в которых все переменные (день испытания; оператор; оборудование) оставались без изменений, достоверных различий не наблюдалось, что указывает на высокую воспроизводимость набора.

### 16.6. Интерферирующие вещества

Поскольку набор QIAamp DSP Circulating NA Kit служит для пробоподготовки и является преаналитическим методом, влияние потенциально интерферирующих веществ можно оценить только в совокупности с последующими диагностическими методами. Было исследовано влияние эндогенных интерферентов при ПЦР анализе набором theascreen® PIK3CA RGQ PCR Kit на мутации ДНК, выделенной набором QIAamp DSP Circulating NA Kit в концентрациях интерферирующих веществ, представленных в таблице 3.

Таблица 3: Концентрации эндогенных интерферентных веществ

| Интерферент | Концентрация |
|-------------|--------------|
|-------------|--------------|



|                             |                         |
|-----------------------------|-------------------------|
| Гемоглобин                  | 2 г/л                   |
| Триглицериды                | 37 ммоль/л (32.7 г/л)   |
| Альбумин                    | 30 мг/мл                |
| Конъюгированный билирубин   | 342 ммоль/л (0.288 г/л) |
| Неконъюгированный билирубин | 342 ммоль/л (0.2 г/л)   |

Для проверки того, что интерферент не влияет на эффективность анализа, должны были выполняться следующие критерии приемлимости:

- Для положительных по мутации образцов «Образцы для испытаний» расчетная разница между образцом с интерферентом и контролем, не содержащим интерферента, не должна быть статистически значимой (значение  $p > 0,05$ , результаты показаны в таблице 4), или, если значение  $p$  значимо, то;
- Абсолютное значение разницы в  $\Delta Ct$  между образцом с введенным интерферентом и контрольным образцом без интерферента должно быть меньше 3х промежуточных точностей анализа (результаты показаны в таблице 5).

Таблица 4: Статистическая значимость разницы между образцами с интерферентами и пустыми пробами (p-значение)

| Мутация      | E542K  | E545K | Q546R | C420R | H1047R |
|--------------|--------|-------|-------|-------|--------|
| Альбумин     | 0.216  | 0.122 | 0.083 | 0.681 | 0.007* |
| С-билирубин  | 0.057  | 0.081 | 0.846 | 0.099 | 0.769  |
| Гемоглобин   | 0.005* | 0.169 | 0.13  | 0.636 | 0.482  |
| Триглицериды | 0.31   | 0.081 | 0.279 | 0.213 | 0.473  |
| Ус-билирубин | 0.537  | 0.169 | 0.796 | 0.249 | 0.374  |

\* Статистически значимые различия

Таблица 5: Разница и значение трехкратной точности для статистически значимых различий

| Мутация | Интерферент | Расчетная разница | 3 x точность | Критерии приемлимости выполнены |
|---------|-------------|-------------------|--------------|---------------------------------|
| E542K   | ACL         | -0.28             | 1.002        | Да                              |
|         | Гемоглобин  | -0.307            | 1.002        | Да                              |
| E545K   | ACW2        | -0.54             | 1.851        | Да                              |
| Q546R   | ACW2        | -0.392            | 1.332        | Да                              |
|         | ЭДТА        | -0.315            | 1.332        | Да                              |
| H1047R  | Альбумин    | -0.35             | 1.692        | Да                              |

Критерии приемлимости для этого исследования были выполнены. Данные этого исследования показали, что тестируемые интерференты не влияли на экстракцию и ПЦР анализ образцов с мутациями и дикого типа. Даже в случаях, где наблюдалась значительная разница, она была в пределах 3-кратной промежуточной точности (таблица 5) анализа и, следовательно, это в пределах присущей анализу вариативности.

Данные этого исследования подтвердили, что эндогенные вещества, которые могут присутствовать в исследуемом образце, не влияют на эффективность выделения ДНК.

#### 16.7. Выход ДНК

Набор QIAamp DSP Circulating NA Kit подходит для применения в сочетании с различными последующими диагностическими исследованиями in vitro. Нуклеиновые кислоты, выделен-

ные и очищенные с помощью набора QIAamp DSP Circulating NA Kit, можно использовать для ПЦР, секвенирования и масс-спектрометрии.

## 17.Маркировка

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие обозначения:

|                                                                                     |     |                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------------------------------|
|    | <N> | Содержит реагенты, достаточные для тестов <N>                   |
|    |     | Смотрите инструкции по применению                               |
|    |     | Использовать до                                                 |
|    |     | Для диагностики In vitro                                        |
|    |     | Каталожный номер                                                |
|    |     | Номер партии                                                    |
|    |     | номер материала                                                 |
|    |     | Компоненты                                                      |
|   |     | Объем                                                           |
|  |     | Диапазон температур                                             |
|  |     | Производитель                                                   |
|  |     | По прибытии                                                     |
|  |     | Открыть при доставке; храните колонки QIAamp MinElute при 2-8°C |
|  |     | Запишите текущую дату после добавления этанола во флакон        |
|  |     | Добавление                                                      |
|  |     | Запишите текущую дату после добавления изопропанола во флакон   |
|  |     | Изопропанол                                                     |
|  |     | Содержит                                                        |
|  |     | Лиофилизированный                                               |
|  |     | Восстановить в                                                  |
|  |     | Этанол                                                          |
|  |     | Гуанидин тиоцианат                                              |



|                                                                                   |                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>GuHCl</b>                                                                      | Гуанидин гидрохлорид                          |
| <b>MALEIC ACID</b>                                                                | Малеиновая кислота                            |
| <b>SUBT</b>                                                                       | Субтилизин                                    |
| <b>GTIN</b>                                                                       | Глобальный торговый номер                     |
|  | Внимание!                                     |
| Rn                                                                                | R - версия инструкции, а n - номер пересмотра |
| →                                                                                 | Приводит к                                    |

## 18.Требование к охране окружающей среды.

Медицинское изделие при использовании, транспортировке и хранении, не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду.

## 19.Утилизация

Чтобы избежать возможного загрязнения окружающей среды, изделие с истекшим сроком годности, отходы использованных реагентов, а также, в случае видимых повреждений индивидуальной упаковки, изделие должно утилизироваться местными публично-правовыми организациями, в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

На территории Российской Федерации набор QIAamp DSP Circulating NA Kit должен утилизироваться в соответствии с нормативными требованиями для отходов класса Б (как материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью или другими биологическими жидкостями) – после химических методов обеззараживания и аппаратных способов обеззараживания с применением физических методов в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21).

## 20.Контактная информация

Техническую поддержку и дополнительную информацию можно получить в центре технической поддержки по ссылке [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), позвонив по номеру 00800-22-44-6000, или обратившись в отдел технической поддержки QIAGEN или к местным дистрибьюторам (см. на сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## 21.Гарантийные обязательства

Компания QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ) принимает на себя гарантийные обязательства в отношении медицинского изделия по отсутствию дефектов и соответствию заявленным производителем характеристикам в течение всего срока годности, при соблюдении условий, указанных в инструкции по применению.

Производитель не несёт ответственности за повреждения или несчастные случаи в результате неправильного использования, ошибки пользователя или внешних чрезвычайных ситуаций. По вопросам качества продукции обращайтесь к уполномоченному представителю производителя.

## 22.Рекламации

**Производитель/разработчик медицинского изделия:**  
QIAGEN GmbH / КАЙДЖЕН ГмбХ

Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany/ Кайджен Штрассе 1, 40724 Хильден, Германия  
Номер телефона: +49-02103-29-0  
Адрес электронной почты: info@qiagen.com;  
Сайт: www.qiagen.com

**Уполномоченный представитель производителя на территории Российской Федерации:**

Общество с ограниченной ответственностью "Кайджен РУС" (ООО "Кайджен РУС")  
Россия, 123112, г. Москва, Пресненская набережная, дом 6, строение 2, этаж 50, помещение 5001  
Номер телефона: +7 499 703 15 56  
Адрес электронной почты: qiagenrus@qiagen.com

### 23. Ссылки

1. Levy, B. (2019) Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology. 2nd ed. New York: Humana Press.
2. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? Clin Chem. **56**, 1210-1211.
3. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. Nat Rev Clin Oncol **15**, 541-563.
4. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. Genome Med **10**, 21.
5. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. Clin Chem Lab Med. **57**, 932-953.

### 24. Руководство по устранению неисправностей

Руководство по поиску и устранению неисправностей может помочь в решении потенциальных проблем. Для того, чтобы получить более подробную информацию в отношении информации и протоколов, содержащихся в данной инструкции, или технологий анализа и получения образцов, обратитесь к специалистам технической службы QIAGEN (контактные данные доступны по адресу: www.qiagen.com) или к своему дистрибьютеру.

#### Комментарии и предложения по устранению неисправностей

*Незначительное количество или отсутствие нуклеиновой кислоты в элюате.*

|                                                                                        |                                                                                                                                                                                                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Пробирка для забора образцов крови содержит антикоагулянт, который не является ЭДТА | Использование другого антикоагулянта, нежели ЭДТА, может привести к ускоренному распаду ДНК в образцах крови                                                                                                |
| б) Длительный период времени между получением образцов крови и подготовкой плазмы      | Клетки крови могут распасться и высвободить в плазму геномную ДНК, разбавляющую целевую нуклеиновую кислоту                                                                                                 |
| в) Процесс заморозки/размораживания образцов происходил более одного раза              | Запрещается многократно замораживать и размораживать образцы, так как это может привести к распаду ДНК. Всегда используйте свежие образцы или образцы, которые размораживались всего один раз.              |
| г) Низкое содержание целевой ДНК в образцах                                            | Образцы слишком долго хранились при комнатной температуре. Необходимо повторить процедуру выделения, используя свежие образцы.                                                                              |
| д) Неполное растворение образца в буфере ACL                                           | Если протеиназа К была подвержена воздействию повышенной температуры продолжительный период времени, она может утратить свою активность. Повторите процедуру, используя новые образцы и свежую протеиназу К |



|                                                                                              |                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| е) Смесь буфера ACL с носителем РНК Carrier недостаточно эффективно перемешана               | Перемешайте буфер ACL с носителем РНК Carrier, перемешивая пробирку с со смесью по меньшей мере 10 раз.                                                                                      |
| ж) Используется низкопроцентный этанол вместо 96-100%                                        | Повторите процедуру очистки, используя новые образцы и 96-100% этанол. Не используйте денатурированный спирт, который может содержать другие вещества, такие, как метанол или метилэтилкетон |
| з) Буфер ACB подготовлен неправильно                                                         | Убедитесь в том, что концентрат буфера ACB был разведен достаточным объемом изопропанола (без этанола).                                                                                      |
| и) Буфер ACW1 или ACW 2 подготовлен неверно                                                  | Убедитесь в том, что концентраты промывочногобуфера ACW1 или ACW 2 разведены правильным объемом этанола. Повторите процедуру выделения, используя новые образцы.                             |
| к) Буфер ACW1 или ACW 2 приготовлен с использованием низкопроцентного этанола вместо 96-100% | Убедитесь в том, что концентраты промывочных буферов ACW1 или ACW 2 разбавлены 96-100% этанолом. Повторите процедуру выделения, используя новые образцы.                                     |

ДНК функционирует ненадлежащим образом во время последующих ферментативных реакций

|                                                  |                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Низкое содержание или отсутствие ДНК в элюате | Смотрите «Низкое содержание или отсутствие нуклеиновой кислоты в элюате» для того, чтобы установить возможные причины. Увеличьте количество элюата, добавляемого в реакцию, если это возможно.                   |
| б) Используется ненадлежащий элюирующий объем    | Определите максимальный объем элюата, подходящий для вашей реакции амплификации. Увеличьте или уменьшите объем элюата, добавляемого в реакцию амплификации. При необходимости скорректируйте элюирующий объем.   |
| в) Буферы не перемешаны должным образом          | Соли и этанол промывочного буфера ACW2 могут отделяться друг от друга, если смесь не используется в течение продолжительного периода времени. Всегда тщательно перемешивайте буферы перед каждым использованием. |
| д) Интерференция от Носителя РНК Carrier         | Если присутствие носителя РНК Carrier в элюате препятствует ферментативным реакциям, необходимо уменьшить его количество или не использовать.                                                                    |

Общее использование

|                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| а) Забита мембрана центрифужной колонки QIAamp Mini | Аккуратно извлеките колонку QIAamp Mini из узла, состоящего из удлинителя колонки и коннектора VacConenctor. Разместите ее в 2 мл промывочной пробирке и обработайте в центрифуге при полной скорости до тех пор, пока образец не пройдет через мембрану полностью. Установите на место колонку QIAamp Mini и содержащий остатки лизата узел, состоящий из удлинителя колонки и коннектора VacConenctor. Включите вакуумный насос и продолжите пропускать оставшийся лизат через колонку.<br>Повторите вышеуказанную процедуру, если колонка |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|



|                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                               | <p>QIAamp Mini все еще забита.</p> <p>Из-за заморозки и размораживания в плазме могут образовываться криопреципитаты. Данные криопреципитаты могут засорить колонку QIAamp Mini. Не используйте плазму, если она замораживалась и размораживалась более одного раза. Если присутствуют криопреципитаты, очистите образец путем его обработки в центрифуге в течение 5 минут при 16,000 g.</p>                                                                                                                                                                                                            |
| б) Переменные объемы элюирования                              | <p>Для различных образцов могут потребоваться различные объемы элюирующего раствора. Объем элюирующего раствора должен быть на 5 мкл больше требуемого объема элюата.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| в) Вакуумное давление от -800 до -900 мбар не было достигнуто | <p>Вакуумный коллектор негерметичен. Нажмите на крышку вакуумного коллектора после ее закрытия. Убедитесь в том, что было достигнуто необходимое вакуумное давление.</p> <p>Прокладка крышки коллектора изношена. Визуально проверьте герметичность коллектора и замените прокладку крышки, если необходимо.</p> <p>Соединение с вакуумным насосом негерметично. Закройте все разъемы с помощью заглушек и включите вакуумный насос. Убедитесь в том, что вакуумное давление является стабильным после включения насоса. Замените соединения между насосом и вакуумным коллектором, если необходимо.</p> |

## 25. Редакция документа

| Дата              | Изменения                 |
|-------------------|---------------------------|
| R4, сентябрь 2019 | Добавлен краткий протокол |

## Приложение 1: Рекомендации по получению и хранению плазмы крови

Для того, чтобы выделить циркулирующие внеклеточные нуклеиновые кислоты из образцов плазмы крови, мы рекомендуем соблюдать протокол, который предусматривает обработку образцов в центрифуге на большой скорости с целью удаления клеточных примесей, тем самым уменьшая количество клеточных и геномных ДНК в образце.

1. Отбирайте образцы крови в пробирки, которые содержат ЭДТА в качестве антикоагулянта. При необходимости перенесите образцы крови с ЭДТА в центрифужные пробирки.

2. Обработайте образцы крови в центрифуге в течение 10 минут при 1900 g (3000 rpm) при температуре 4°C.

3. Тщательно аспирируйте супернатант плазмы, не нарушая межклеточного слоя плазмы. Около 4-5 мл плазмы можно получить из одной первичной пробирки объемом 10 мл.

*Примечание: На этой стадии плазму можно использовать для экстракции циркулирующих нуклеиновых кислот. Однако последующее высокоскоростное центрифугирование удалит дополнительный клеточный мусор и загрязнения циркулирующих нуклеиновых кислот геномной ДНК из поврежденных клеток крови*

4. Собранная плазма переносится в новые центрифужные пробирки.

5. Обработайте в центрифуге образцы плазмы в течение 10 минут при 16000 g при температуре 4°C. Это позволит удалить оставшиеся в плазме клеточные примеси и геномные ДНК из повреждённых клеток.



6. Аккуратно извлеките раствор и перенесите его в новую пробирку с помощью пипетки, не поднимая осадок.

7. Если плазма будет использоваться для выделения нуклеиновых кислот в тот же день, храните ее при температуре 2-8°C для дальнейшего использования. В случае необходимости более длительного хранения заморозьте плазму при температуре -80°C. Перед использованием разморозьте пробирку с плазмой при комнатной температуре.

*Примечание:* Для удаления криопреципитатов образцы плазмы центрифугируют в течение 5 минут при 16 000 x g (в роторе с фиксированным углом наклона).

*Примечание:* Перенесите супернатант в новую пробирку, а затем начните протокол выделения циркулирующих нуклеиновых кислот..

КАЙДЖЕН ГмбХ  
Кайджен штрассе 1  
40724 Хильден  
Германия

Номер по реестру 1742/2021 М

Настоящим подтверждаю, что подпись и печать на прилагаемом документе подтвердил в моем присутствии

г-н д-р Бартхолд Пиэнинг, род. 19 ноября 1958 г.  
служебный адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,  
лично мне известный.

Г-н д-р Бартхолд Пиэнинг действует не от своего имени, а от имени компании

**«КАЙДЖЕН ГмбХ»**  
(Адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,

После сверки с электронным торговым реестром Дюссельдорфа, запись под № HR В 45822 I, я удостоверяю, что

- в него внесена компания «КАЙДЖЕН ГмбХ» со штаб-квартирой в г. Хильден;
- в нем зарегистрирован г-н Бартхолд Пиэнинг в качестве Управляющего директора, который всегда вправе представлять Компанию единолично по любому вопросу;
- Г-н д-р Бартхолд Пиэнинг всегда освобожден от ограничений на заключение сделок с самим собой в соответствии с § 181 Гражданского кодекса Германии («ГК»).

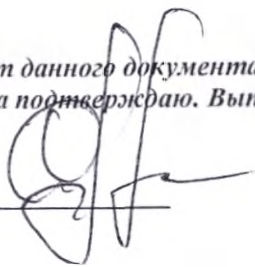
Хильден, 11 августа 2021 года  
Д-р Никлас Майрозе  
Официальный нотариус  
Миттельштрассе 36-38, 40721, Хильден, Германия

[Круглая гербовая печать:  
Д-р Никлас Майрозе  
нотариус в Хильдене]

[Круглая гербовая печать:  
Д-р Никлас Майрозе  
нотариус в Хильдене]



Текст данного документа перевёл переводчик Сербигешева Ольга Анатольевна. Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является правильным, точным и полным.



Российская Федерация  
Город Москва

Двадцатого августа две тысячи двадцать первого года.

Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия Валерьевича, свидетельствую подлинность подписи переводчика Сербигешевой Ольги Анатольевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021-

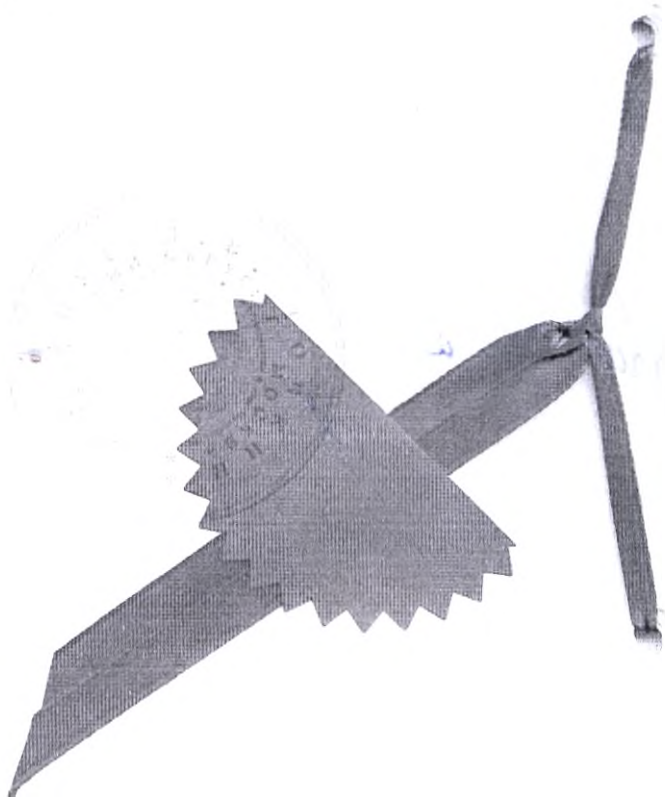
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.

77-1044

Е.В. Журавлева

Всего прошнуровано, пронумеровано  
и скреплено печатью 29 лист(а)(ов)

ВРИО нотариуса



Российская Федерация

Город Москва

23 АВГ 2021

Я, Журавлева Екатерина Владимировна, временно исполняющая обязанности нотариуса города Москвы Точкина Дмитрия Валерьевича, свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: N 77/2079-н/77- 2021

Уплатено за совершение нотариального действия: 1860

Е.В. Журавлева



Всего прошнуровано,  
пронумеровано и скреплено  
печатью 31

Нотариус

Врио  
[Signature]

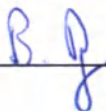




КОПИЯ  
«УТВЕРЖДАЮ» / «APPROVE»  
QIAGEN GmbH

Управляющий директор / Managing Director  
(должность/position)

Бартхолд Пиэнинг / Barthold Piening  
(имя/name)

  
(подпись/signature)

М.П. / Stamp

QIAGEN GmbH  
QIAGEN Straße 1  
40724 Hilden  
Germany

Март 2015г

## ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов

# Набор QIAamp DSP Virus Spin Kit



50

Версия 1

IVD

Для диагностики in vitro



REF

61704



QIAGEN GmbH  
(КАЙДЖЕН ГМБХ)

Qiagen Str. 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)

R6

MAT

1062686EN



Deed Roll No. **1198** / 2021 M

I hereby certify that signature on the document affixed and sealed hereto was authenticated before me by

Mr. Dr. Barthold Piening, born on 19. November 1958,  
business address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden,  
who is personally known to me.

Mr. Dr. Barthold Piening not acting in own matter, but on behalf of

**QIAGEN GmbH**

(Address: QIAGEN Straße 1 in 40724 Hilden.

Upon my inspection to the electronic Commercial register of Düsseldorf under HR B 45822 I hereby certify that:

- there the Company QIAGEN GmbH with headquarters in Hilden is listed;
- there Mr. Dr. Barthold Piening as Managing Director is registered and always empowered to represent the Company solely or together in each matter;
- Mr. Dr. Barthold Piening is always relieved from the restrictions on self-contracting according to § 181 of the German Civil Code ("BGB").

The need for certification and the intended use of the authentic instrument were credibly demonstrated to me, the notary.

I could not inform myself about the content of the certified document because I do not master the language of the document. The notarization does not refer to the correctness of the document.

Hilden, 9 June 2021



  
Dr. Niklas Mairose

Notary public

Mittelstraße 36-38, 40721 Hilden, Germany

2N0PE





## Оглавление

|                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Наименование изделия .....                                                                  | 5  |
| 2. Производитель.....                                                                          | 5  |
| 3. Назначение, показания к применению, противопоказания.....                                   | 5  |
| 4. Сведения о потенциальных потребителях .....                                                 | 6  |
| 5. Общие сведения.....                                                                         | 6  |
| 6. Принцип действия .....                                                                      | 6  |
| 7. Комплектность набора .....                                                                  | 8  |
| 8. Необходимые материалы, не входящие в комплект набора .....                                  | 9  |
| 9. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения .. | 9  |
| 10. Предупреждения и меры предосторожности .....                                               | 9  |
| 11. Срок годности.....                                                                         | 12 |
| 12. Хранение и перемещение реагентов .....                                                     | 13 |
| 13. Хранение и перемещение образцов.....                                                       | 13 |
| 14. Процедура .....                                                                            | 13 |
| 14.1. Протокол: Выделение вирусной нуклеиновой кислоты из плазмы и сыворотки .....             | 16 |
| 15. Контроль качества.....                                                                     | 18 |
| 16. Эксплуатационные характеристики .....                                                      | 18 |
| 16.1. Линейность .....                                                                         | 18 |
| 16.2. Предел обнаружения.....                                                                  | 18 |
| 16.3. Прецизионность и воспроизводимость .....                                                 | 18 |
| 16.4. Перекрестная реактивность. Точность.....                                                 | 18 |
| 16.5. Интерферирующие вещества .....                                                           | 19 |
| 16.6. Клиническая специфичность .....                                                          | 19 |
| 17. Маркировка.....                                                                            | 19 |
| 18. Требование к охране окружающей среды.....                                                  | 20 |
| 19. Утилизация .....                                                                           | 20 |
| 20. Контактная информация.....                                                                 | 20 |
| 21. Гарантийные обязательства .....                                                            | 20 |
| 22. Уполномоченный представитель производителя на территории Российской Федерации: .....       | 21 |
| Приложение А: Автоматизированный процесс выделения с использованием станции QIAcube .....      | 21 |
| Редакция документа .....                                                                       | 21 |



## **КАЙДЖЕН, Технологии для отбора образцов и проведения анализов**

Компания QIAGEN — ведущий поставщик инновационных технологий отбора и анализа проб, позволяющих выделять и распознавать компоненты любых биологических образцов. Наши высокотехнологичные продукты и услуги отличаются высоким качеством и обеспечивают успех на всех этапах работы, от взятия образца до получения результата анализа.

QIAGEN задает стандарты в таких областях, как:

- Очистка ДНК, РНК и белков
- Анализ нуклеиновых кислот и белков
- Исследование микро-РНК и РНК-интерференции
- Автоматизация технологических процессов отбора и анализа проб

Наша миссия заключается в том, чтобы помогать вам добиваться выдающихся успехов и совершать прорывы. Более подробную информацию см. на веб-сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## 1. Наименование изделия

Набор для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов в варианте исполнения:  
Вариант 4:

Набор QIAamp DSP Virus Spin Kit,

в составе:

1. Колонки QIAamp MinElute с промывочными пробирками (2 мл) WT (50 шт.).
2. Пробирки для лизиса (2 мл) LT (50 шт.).
3. Пробирки для элюирования (1,5 мл) ET (50 шт.).
4. Промывочные пробирки (2 мл) WT (5 x 50 шт.).
5. Буфер для лизиса (33 мл) AL (1 шт.).
6. Промывочный буфер 1 (концентрат) (19 мл) AW1 (1 шт.).
7. Промывочный буфер 2 (концентрат) (13 мл) AW2 (1 шт.).
8. Элюирующий буфер (2 мл) AVE (4 шт.).
9. Растворитель протеиназы (4,4 мл) PS (1 шт.).
10. Носитель РНК Carrier (310 мкг) (1 шт.).
11. Протеиназа QIAGEN (760 мкл) (1 шт.).
12. Инструкция по применению.

## 2. Производитель

QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ)

Qiagen Strasse 1, 40724 Hilden, Germany (Германия)

Номера телефонов: +49-02103-29-0

Адрес электронной почты: [info@qiagen.com](mailto:info@qiagen.com);

Сайт: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

## 3. Назначение, показания к применению, противопоказания.

### Назначение

Для выделения нуклеиновых кислот из биологических образцов методом селективного связывания на мембране из диоксида кремния.

### Описание

Набор QIAamp DSP Virus Spin Kit (далее набор, набор реагентов, QIAamp DSP Virus Spin Kit) представляет собой систему, использующую технологию селективного связывания нуклеиновых кислот (НК) на мембране из диоксида кремния (QIAamp технология) для выделения и очистки вирусных нуклеиновых кислот из биологических образцов сыворотки и плазмы крови.

Набор QIAamp DSP Virus Spin Kit - это готовое к использованию медицинское изделие для выделения и очистки вирусных нуклеиновых кислот из образцов ЭДТА-плазмы и сыворотки крови.

Набор рассчитан на обработку 50 образцов.

Время полного цикла анализа с использованием набора не превышает 90 минут.

### Показания к применению

Набор QIAamp DSP Virus Spin Kit предназначен для выделения вирусных нуклеиновых кислот в качестве этапа пробоподготовки для последующего анализа очищенных нуклеиновых кислот в клинической лабораторной диагностике, в частности методом ПЦР.

Является преаналитическим методом, набор QIAamp DSP Virus Spin Kit предназначен для подготовки образцов, но не для получения результатов исследований, качественных или количественных.

### Противопоказания к применению

При использовании специально обученным персоналом и с учетом применения по назначению противопоказания не выявлены.



#### 4. Сведения о потенциальных потребителях

Набор должен использоваться только квалифицированным персоналом (лаборантами или врачами клинической лабораторной диагностики, владеющими методами молекулярно-биологических исследований для диагностики *in vitro*) в условиях профессиональной клиничко-диагностической лаборатории. Пользователь также должен иметь навыки, необходимые для правильного выполнения исследований, описанных в данной инструкции по применению.

Медицинское изделие предназначено только для профессионального использования. Набор предназначен для диагностики *in vitro*.

#### 5. Общие сведения

В наборе QIAamp DSP Virus Spin Kit используется известная технология для одновременного выделения и очистки вирусных ДНК и РНК. В наборе используется сочетание селективности мембран на основе диоксида кремния и вариативность объемов элюирования от 20 до 150 мкл. Процедура может использоваться для плазмы и сыворотки крови. Могут использоваться как свежие, так и замороженные образцы при условии, что они замораживались и размораживались не более одного раза. Вирусные нуклеиновые кислоты, элюированные буфером AVE, могут сразу использоваться в дальнейших исследованиях или храниться при температуре от -25°C до -15°C.

#### 6. Принцип действия

Процедура выделения вирусных ДНК и РНК с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit включает 4 этапа (лизис, связывание, промывка и элюирование) и проводится с использованием колонок QIAamp MinElute в стандартной центрифуге или полностью автоматически при использовании станции QIAcube (Приложение А). Данная процедура позволяет минимизировать перекрёстную контаминацию образцов и повысить безопасность во время работы с потенциально инфицированными образцами. Набор QIAamp DSP Virus Spin Kit подходит для одновременной обработки 50 образцов. Набор может использоваться для выделения вирусной ДНК и РНК широкого диапазона вирусов, однако эффективность данного набора реагентов для каждого отдельного вида вирусов не определялась и должна оцениваться пользователем.

##### Лизис с использованием протеиназы QIAGEN

Образцы лизируются в денатурирующих условиях при повышенной температуре. Лизис осуществляется в присутствии Протеиназы QIAGEN и буфера AL, которые совместно инактивируют РНКазы.

##### Адсорбция на мембране QIAamp MinElute.

Адсорбция регулируется путем добавления этанола для оптимизации связывания НК с мембраной. Лизаты затем перемещаются на колонку QIAamp MinElute и вирусные нуклеиновые кислоты адсорбируются на мембране из диоксида кремния по мере того, как лизат проходит через мембрану при центрифугировании. Солевой баланс и уровень pH обеспечивают, что белки и загрязнения, которые могут ингибировать последующий анализ методом ПЦР, не остаются на мембране колонки QIAamp MinElute.

Пробирки 2 мл (в комплекте) необходимы для колонок QIAamp MinElute в процессе загрузки и элюирования.

##### Удаление остаточных примесей

Нуклеиновые кислоты остаются связанными на мембране, в то время как загрязнения вымываются в процессе трех стадий. В упрощенной процедуре изначально достаточно чистая вирусная ДНК и РНК элюируется буфером AVE при комнатной температуре.

##### Элюирование очищенной нуклеиновой кислоты

Элюирование осуществляется с использованием буфера AVE. Колонки QIAamp MinElute обеспечивают минимальный элюирующий объем в 20 мкл. Меньший объем приводит к сильноконцентрированным элюатам НК.

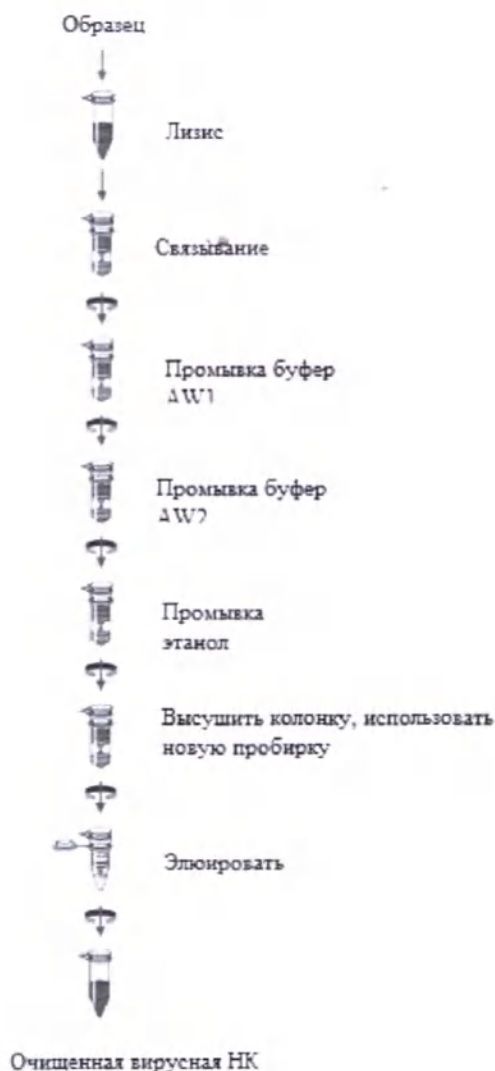
При последующих исследованиях, которые нуждаются в небольших изначальных объемах пробы (например, ПЦР и ПЦР с обратной транскрипцией), элюат с большей концентрацией НК может повысить чувствительность анализа.

При проведении последующего анализа, который нуждается в большем исходном объеме, объем элюирования можно увеличить до 150 мкл. Однако увеличение элюирующего объема приведет к уменьшению концентрации нуклеиновых кислот в элюате.

Получаемый объем элюата может быть до 5 мкл меньше объема используемого элюирующего буфера, например, при элюирующем объеме в 20 мкл объем конечного элюата будет >15 мкл. Объем получаемого элюата также зависит от характера образца.

Элюированная нуклеиновая кислота собирается в 1,5 мл пробирки для элюирования (поставляются в комплекте). Рекомендуется хранить полученные ДНК или РНК при температуре ниже -20 °С.

Выход вирусной нуклеиновой кислоты, выделенной из биологических образцов, обычно составляет менее 1 мкг. Для определения выхода НК рекомендуются методы количественной амплификации. При количественном определении нуклеиновых кислот, выделенных с помощью протокола для QIAamp DSP Virus Spin Kit, необходимо учитывать, что в образце будет значительно больше РНК-носителя, чем вирусной РНК.





## Носитель РНК

Носитель РНК служит для двух целей. Во-первых, он усиливает связь между вирусными нуклеиновыми кислотами и мембраной QIAamp MinElute, особенно если в образце присутствует незначительное количество целевых молекул. Во-вторых, добавление носителя РНК снижает вероятность деградации вирусной РНК в том редком случае, когда молекулы РНКазы избегают денатурации хаотропными солями и детергентом в буфере для лизиса AL. Если носитель РНК не добавляется в буфер AL, это приведет к уменьшению количества выделяемых РНК и ДНК.

Эффективность амплификационных систем варьируются в зависимости от общего количества нуклеиновой кислоты, которая присутствует в реакции. Элюаты, полученные с использованием данного набора, содержат вирусные нуклеиновые кислоты и носитель РНК. Количество носителя РНК значительно превышает количество вирусных нуклеиновых кислот. Поэтому расчеты того, сколько элюата следует добавить в последующую амплификацию, должны основываться на количестве добавленного РНК-носителя. Для получения наиболее высоких уровней чувствительности в реакциях амплификации может потребоваться корректировка количества носителя РНК, добавляемого в буфер AL.

### Добавление внутреннего контроля

Использование протокола выделения вирусных НК в комбинации с доступными амплификационными системами может требовать использование внутреннего контроля в процессе выделения и очистки НК. Внутренний контроль РНК или ДНК должен добавляться вместе с носителем РНК в буфер для лизиса. Для оптимальной эффективности очистки, молекулы внутреннего контроля должны быть длиннее 200 нуклеотидов, так как более мелкие молекулы не извлекаются эффективно. Для определения оптимальной концентрации обратитесь к инструкциям производителя. Использование концентрации, отличной от рекомендованной, может снизить эффективность амплификации.

## 7. Комплектность набора

### Состав набора

| Набор QIAamp DSP Virus Spin Kit |                                                             |                        |            |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|------------------------|------------|
|                                 |                                                             | Каталожный номер 61704 |            |
|                                 |                                                             | Количество реакций 50  |            |
| Обозначение                     | Описание                                                    | Идентификация          | Количество |
| QIAamp MinElute                 | Колонки QIAamp MinElute с промывочными пробирками (2 мл) WT | COL                    | 50 шт      |
| LT                              | Пробирки для лизиса (2 мл) LT                               | LYS TUBE               | 50 шт      |
| ET                              | Пробирки для элюирования (1,5мл) ET                         | ELU TUBE               | 50 шт      |
| WT                              | Промывочные пробирки (2 мл) WT                              | WASH TUBE              | 5 x 50 шт  |
| AL                              | Буфер для лизиса* (33мл) AL                                 | LYS BUF                | 1 шт       |
| AW1                             | Промывочный буфер 1* (концентрат) (19 мл) AW1               | WASH BUF 1 CONC        | 1 шт       |
| AW2                             | Промывочный буфер 2** (концентрат) (13 мл) AW2              | WASH BUF 2 CONC        | 1 шт       |
| AVE                             | Элюирующий буфер** (2 мл) AVE (фиолетовые колпачки)         | ELU BUF                | 4 шт       |
| PS                              | Растворитель протеиназы** (4,4 мл) PS                       | QPROT SOLV             | 1 шт       |
| Carrier                         | Носитель РНК Carrier (310 мкг) (красные колпачки)           | CAR RNA                | 1 шт       |
| QP                              | Протеиназа QIAGEN*** (760 мкл)                              | QPROT                  | 1 шт       |
| Руководство пользователя        |                                                             |                        | 1 шт       |



\* содержит хаотропные соли. См. раздел «Предупреждения и меры предосторожности»

\*\* содержит азид натрия в качестве консерванта

\*\*\* см. «Подготовка реагентов и буферов»

*Примечание: При работе с химикатами всегда надевайте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Для получения дополнительной информации обратитесь к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые можно получить у поставщика продукта или в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).*

## 8. Необходимые материалы, не входящие в комплект набора

- Этанол (96-100%)\*
- Пипетки (регулируемые) и наконечники для пипеток, свободные от нуклеаз (во избежание перекрестного загрязнения рекомендуются наконечники для пипеток с аэрозольными барьерными фильтрами)
- Термомиксер или нагревательный блок\*\* для лизиса при 56°C
- Микроцентрифуга\*\* (с ротором на 1,5 и 2 мл пробирки)
- Вортекс
- Для образцов менее 200 мкл: 0,9% раствор NaCl

\* не используйте денатурированный этанол, который содержит примеси метанола и метилэтилкетона

\*\* убедитесь, что инструменты проверены и откалиброваны согласно рекомендациям производителя

## 9. Перечень лекарственных средств, материалов животного и (или) человеческого происхождения

Лекарственные средства, материалы человеческого и животного происхождения: не используются.

## 10. Предупреждения и меры предосторожности

Для диагностики *in vitro*

### Правила техники безопасности

При работе с химикатами всегда используйте лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки.

Для получения дополнительной информации ознакомьтесь с соответствующими паспортами безопасности (SDS). Эти паспорта можно получить в компактном и удобном формате PDF на сайте [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), где можно найти, распечатать SDS каждого набора компании QIAGEN и каждого компонента в наборе. Утилизацию образцов и отходов после анализа следует проводить в соответствии с местными нормами безопасности.

### Общие меры предосторожности

Следует всегда обращать внимание на следующее:

- Набор предназначен только для профессионального применения в клинической лабораторной диагностике.
- Анализ следует проводить с образцами сыворотки или плазмы крови
- Следует допускать к работе только обученный персонал.
- Следует использовать одноразовые перчатки без талька талька, халат и защитные очки. Для получения дополнительной информации по безопасности можно обратиться к соответствующим паспортам безопасности (SDS), которые размещены в режиме онлайн в формате PDF по ссылке [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety).
- Запрещается использовать набор или компоненты с истекшим сроком годности и/или поврежденной упаковкой компонентов набора.
- Со всеми образцами следует обращаться как с потенциально биологически опасными веществами. Утилизацию образцов и отходов на различных стадиях обработки образца

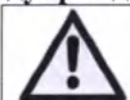


следует проводить в соответствии с местными/национальными правилами утилизации через уполномоченные организации в данном регионе.

- До, вовремя и после применения этого набора, все потенциально опасные материалы (то есть материалы, которые могли войти в контакт с клиническими образцами), включая пробирки, наконечники и прочие материалы, следует обрабатывать и утилизировать в соответствии с применимыми и соответствующими муниципальными / правительственными нормами, действующими в месте применения этого продукта.
- Не следует хранить открытыми флаконы с реагентами.
- Следует использовать калиброванные пипетки и инструменты.
- Следует использовать наконечники с фильтрами для пипеток
- Все поставляемые реагенты в наборах предназначены для использования только с другими реагентами из того же набора. Не следует заменять реагенты из набора на реагенты из других наборов, в том числе аналогичных, так как это может снизить эффективность работы.

*Примечание: Набор реагентов не содержит материалов биологического происхождения, веществ, обладающих канцерогенным, мутагенным действием, а также влияющих на репродуктивную функцию человека. При использовании по назначению и соблюдении мер предосторожности является безопасным*

## Предупреждения



**ВНИМАНИЕ: не добавляйте отбеливатель или кислотные растворы непосредственно в отходы, содержащие буфер AL и буфер AW1**

Буферы AL и AW1 содержат гуанидингидрохлорид, который способен создавать высоко реакционноспособные вещества при соединении с отбеливателем.

В случае пролива жидкости, содержащей вышеперечисленные буферы, необходимо произвести очистку с использованием лабораторных детергентов и воды. Если разлитая жидкость потенциально инфицирована, сначала очистите зараженную зону лабораторным детергентом и водой, а затем 1 % раствором (объемного содержания) гипохлорита натрия.

В случае повреждения или протекания флаконов с буфером, наденьте перчатки и защитные очки во время утилизации флаконов, чтобы избежать вреда для своего здоровья и здоровья окружающих.

Компания QIAGEN не проводила испытаний жидких отходов, получаемых после выполнения процедур с использованием набора, на остаточные инфекционные материалы. Загрязнение жидких отходов остаточными инфекционными материалами маловероятно, но ее не стоит полностью исключать. Следовательно, жидкие отходы необходимо считать инфекционными, обрабатывать и утилизировать в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

К компонентам набора QIAamp DSP Virus Spin Kit применяются следующие коды риска и безопасности.

|                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Буфер AL,<br/>Буфер AW1</b></p>  | <p>Содержит гуанидин гидрохлорид.<br/>Может представлять опасность при попадании в пищеварительный тракт или дыхательные пути. Вызывает раздражение кожи. Вызывает серьезное раздражение глаз. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу в случае плохого самочувствия. Утилизируйте раствор/контейнер в специализированной установке, предназначенной для утилизации отходов. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз и лица.</p> |
| <p><b>Протеиназа<br/>QIAGEN</b></p>                                                                                       | <p>Содержит субтилизин.<br/>Вызывает умеренное раздражение кожи. Вызывает серьезное повреждение глаз. Вызывает аллергическую реакцию, приступ астмы или затрудненное дыхание в случае попадания в дыхательные пути. Не вдыхайте пыль/пары/газ/испарения/распыленный продукт.<br/>Утилизируйте раствор/контейнер в специализированной установке,</p>                                                                                                                 |





предназначенной для утилизации отходов. Обратитесь в токсикологический центр или к врачу. В случае попадания в глаза промойте глаза водой в течение нескольких минут. Снимите контактные линзы, если есть. Продолжайте промывать глаза. При попадании в дыхательные пути: в случае затрудненного дыхания перенесите пострадавшего на свежий воздух и оставьте его в покое, в положении, удобном для дыхания. Немедленно обратитесь в токсикологический центр или к врачу. Надевайте защитные перчатки/защитную одежду/ средства защиты глаз и лица. Используйте средства для защиты дыхательных путей.

### **Меры предотвращения загрязнения**

Рибонуклеазы (РНКазаы) являются очень стабильными и активными ферментами, которым обычно не требуются дополнительные факторы для функционирования. Так как РНКазаы трудно инактивировать, даже небольшого их количества достаточно для того, чтобы разрушить РНК. Не используйте пластиковую или стеклянную посуду без предварительного удаления РНКаза. Необходимо предпринять соответствующие меры для того, чтобы предотвратить попадание РНКаза в образец во время или после процедуры выделения РНК. Для того, чтобы создать среду, не содержащую РНКаза, необходимо соблюдать следующие условия во время предварительной обработки и использования многоразовых или одноразовых сосудов и растворов во время работы с РНК.

Работу с РНК необходимо проводить в чистых помещениях. В пыли и на руках могут находиться бактерии и плесневые грибки. Они являются наиболее частыми источниками РНКаза. Всегда надевайте перчатки во время работы с реагентами и образцами для того, чтобы предотвратить попадание РНКаза с поверхности кожи или запыленного лабораторного оборудования. Часто меняйте перчатки и держите пробирки закрытыми, если вы их не используете в данный момент. Во время работы с очищенной РНК при дальнейшем использовании храните аликвоты на льду.

#### Одноразовая пластиковая посуда

Используйте стерильные, одноразовые полипропиленовые пробирки с маркировкой «без РНКаза». Данные пробирки не содержат РНКаза и не нуждаются в предварительной обработке при использовании.

#### Многоразовая пластиковая посуда

Пластиковая посуда многоразового использования должна предварительно обрабатываться для того, чтобы предотвратить загрязнение РНКазами.

Пластиковая посуда должна тщательно промываться 0,1 М NaOH, 1 мМ ЭДТА, а затем водой, не содержащей РНК. Также пластиковую посуду, устойчивую к хлороформу, можно промыть раствором хлороформа для того, чтобы инактивировать РНКазаы.

#### Стеклянная посуда

Стеклянная посуда должна обрабатываться перед использованием для того, чтобы предотвратить загрязнение РНКазами. Стеклянная посуда, используемая для работы с РНК, должна очищаться моющим средством, хорошо промываться и термически обрабатываться при температуре 240°C, по меньшей мере, в течение 4 часов (в течение ночи, если возможно) перед использованием. Обработка посуды только в автоклаве не инактивирует все РНКазаы. Кроме того, стеклянная посуда может обрабатываться диэтилпирокарбонатом. Заполните посуду раствором 0,1% диэтилпирокарбоната (0,1 % в воде) и оставьте на ночь (12 часов) при температуре 37°C. Затем обработайте в автоклаве или при нагревании при 100°C в течение 15 минут для того, чтобы устранить остатки диэтилпирокарбоната.

#### Резервуары для электрофореза

Резервуары для электрофореза должны быть очищены раствором детергента (например, 0,5% SDS), тщательно промыты водой, высушены с этанолом,† обработаны 3% перекисью водорода (пластики, используемые в резервуарах для электрофореза, не всегда являются устойчивыми к этанолу, предпримите необходимые меры и ознакомьтесь с инструкциями



поставщика). Через 10 минут при комнатной температуре следует промыть резервуары для электрофореза водой, не содержащей РНКазу.

### Растворы

Растворы (водные и другие растворы) должны обрабатываться 0,1% диэтилпирокарбонатом. Диэтилпирокарбонат является эффективным, но не единственным средством, поглощающим РНКазы. Он обычно используется в концентрации 0,1 % для инактивации РНКаз на поверхности стеклянной и пластиковой посуды или для создания растворов и воды, не содержащих РНКаз. Диэтилпирокарбонат инактивирует РНКазы за счет ковалентной реакции. Добавьте 0,1 мл диэтилпирокарбоната в 100 мл обрабатываемого раствора и хорошо встряхните для того, чтобы диэтилпирокарбонат смешался с раствором. Проинкубируйте раствор в течение 12 часов при температуре 37°C. Обработайте раствор в автоклаве в течение 15 минут для того, чтобы удалить остатки диэтилпирокарбоната. Диэтилпирокарбонат вступает в реакцию с первичными аминами и не может использоваться непосредственно для обработки буфера Трис. Диэтилпирокарбонат очень неустойчив в присутствии буферов Трис и быстро распадается. При приготовлении буферов Трис необходимо в первую очередь обработать воду диэтилпирокарбонатом, а затем растворить Трис для того, чтобы создать подходящий буфер. Даже незначительное количество диэтилпирокарбоната изменяет пуриновые остатки в РНК за счет карбэтоксилирования. Карбэтоксилированная РНК транслируется во внеклеточных системах с очень низкой эффективностью. Однако ее способность создавать гибриды ДНК:РНК или РНК:РНК не сильно меняется, пока не изменится большее количество пуриновых остатков.

**ВАЖНО:** Буферы, входящие в набор QIAamp DSP Virus Spin Kit, не обрабатываются диэтилпирокарбонатом с целью удаления РНКаз и поэтому не считаются загрязненными диэтилпирокарбонатом.

**ВАЖНО:** Во время работы с химическими веществами, всегда одевайте подходящий лабораторный халат, одноразовые перчатки и защитные очки. Чтобы получить дополнительную информацию, смотрите подходящие паспорта безопасности материала, которые предоставляются поставщиком продукции.

### **Ограничения**

Эффективность набора была определена при использовании плазмы и сыворотки крови для выделения вирусных НК.

Для достижения оптимальных результатов необходимо строгое соблюдение данной инструкции по применению. Не рекомендуется разбавление реагентов, отличное от описанного в данной инструкции, которое приводит к потере производительности.

Следует обратить внимание на сроки годности и условия хранения, указанные на упаковке и этикетках всех компонентов. Не используйте просроченные или неправильно хранящиеся компоненты.

Для того, чтобы минимизировать риск неправильной интерпретации результатов последующей диагностики, необходимо использовать надлежащие контроли при последующих исследованиях.

Любые полученные диагностические результаты следует толковать вместе с другими клиническими или лабораторными данными.

## **11.Срок годности.**

Срок годности набора QIAamp DSP Virus Spin Kit составляет 24-месяца. Изделие стабильно до истечения срока годности, указанного на этикетке, при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Условия хранения реагентов: при температуре 15-25°C,

Условия хранения колонок QIAamp MinElute - при температуре 2-8°C.

Условия транспортирования: при температуре от -20 до +45°C.



Если изделие предназначено только для периодического применения, после вскрытия флаконов, реагенты необходимо хранить при температуре 15-25°C не более 6 месяцев или до указанного срока годности, в зависимости от того, что наступит раньше.

После истечения срока годности изделие использовать запрещено.

## 12. Хранение и перемещение реагентов

Колонки QIAamp MinElute должны храниться в при температуре 2-8°C после прибытия.

Все буферы могут храниться при комнатной температуре (15-25°C).

Лиофилизированный носитель РНК может храниться при комнатной температуре (15-25°C) до истечения срока годности, указанного на этикетке. Носитель РНК может быть растворен только в буфере AVE; разбавленный носитель РНК должен сразу добавляться в буфер AL. Данный раствор должен приготавливаться непосредственно перед использованием и остается стабильным при температуре 2-8°C до 48 часов. Разбавленный в буфере AVE носитель РНК может быть заморожен в аликвотах и храниться при температуре от -15 до -30°C до 24 месяцев.

Лиофилизированная Протеиназа QIAGEN (QP) может храниться при комнатной температуре (15-25°C) до окончания срока годности без ухудшения характеристик.

Протеиназа QIAGEN (QP), восстановленная в растворителе протеиназы (PS), остается стабильной в течение одного года при хранении при температуре 2-8 °C, но не дольше даты окончания срока годности, указанного для набора. Следует избегать хранения восстановленной протеиназы QIAGEN при комнатной температуре продолжительный период времени.

Разбавленный промывочный буфер 1 (AW1) и промывочный буфер 2 (AW2) остаются стабильными при комнатной температуре (15-25°C) до окончания срока годности, указанного на упаковке.

Срок хранения Набора QIAamp DSP Virus Spin Kit после вскрытия – 6 месяцев.

## 13. Хранение и перемещение образцов

Сыворотку и плазму хранят не более 6 часов при +2°C +8°C, для длительного хранения рекомендуется заморозить в аликвотах при -20°C -80°C. Замороженная плазма или сыворотка не может быть разморожена более одного раза. Многократная заморозка и размораживание приводят к денатурации и осаждению белков, что, в свою очередь, приводит к уменьшению концентрации вируса и выхода вирусных нуклеиновых кислот. Кроме того, криопреципитаты, образующиеся при размораживании замороженных образцов, закупоривают мембрану колонки QIAamp MinElute. Если криопреципитаты видны визуально, их можно осадить путем центрифугирования при 6800 x g в течение 3 минут. Раствор должен использоваться сразу.

## 14. Процедура

### Важные пункты, которые необходимо учитывать перед началом процедуры

- После получения набора проверьте компоненты набора на наличие повреждений. Если упаковки или флаконы с буфером повреждены, свяжитесь со Службой технической поддержки QIAGEN или своим региональным дистрибьютором. В случае разлива жидкости см. пункт «Предупреждения и меры предосторожности». Не используйте поврежденные компоненты набора, поскольку их применение может снижать эффективность набора.
- Всегда меняйте наконечник дозатора между переносами жидкости. Для минимизации перекрестной контаминации мы рекомендуем использовать наконечники с аэрозольным барьером.
- Все этапы центрифугирования выполняйте при комнатной температуре (15-25°C).
- Всегда используйте одноразовые перчатки и регулярно проверяйте их на контаминацию материалом образца. В случае загрязнения утилизируйте перчатки.



- Для минимизации перекрестной контаминации открывайте только по одной пробирке за раз.
- Не рекомендуется использовать компоненты из других наборов, однако при необходимости, компоненты можно использовать только в том случае, если номера партий наборов идентичны.
- Не допускайте микробную контаминацию реактивов из набора.
- Для минимизации риска инфицирования потенциально инфекционным материалом мы рекомендуем работать в проточном ламинарном шкафу до тех пор, пока образцы не пройдут лизис.
- Данный набор могут использовать только сотрудники, обученные лабораторным процедурам для диагностики *in vitro*.

### **Использование колонок QIAamp MinElute**

Из-за высокой чувствительности технологии амплификации нуклеиновых кислот, необходимо предпринять следующие меры безопасности во время использования колонок QIAamp MinElute с целью предотвращения перекрестной контаминации образцами:

- Аккуратно пипеткой переносите образец или раствор в колонку QIAamp MinElute, не касаясь при этом ободка колонки.
- Меняйте наконечники дозаторов при каждом переносе жидкостей. Рекомендуется использовать наконечники с аэрозольным барьером.
- Не касайтесь мембраны колонки QIAamp MinElute наконечником.
- После перемешивания растворов отцентрифугируйте пробирки в течение короткого времени для того, чтобы удалить капли с внутренней части крышки.
- Надевайте перчатки во время выполнения процедур. В случае контакта перчаток с образцом, их необходимо незамедлительно заменить.

### **Центрифугирование**

- Промывочные и элюирующие пробирки входят в состав набора.
- Колонки QIAamp MinElute центрифугируются при скорости приблизительно 6000 x g с целью уменьшения уровня шума. Скорость центрифугирования колонок QIAamp MinElute не влияет на выход ДНК и РНК.
- Для элюирования и сушки по окончании процедуры промывки, центрифугирование должно проводиться при полной скорости.
- Центрифугирование должно осуществляться при комнатной температуре (15-25°C).

### **Работа с колонками QIAamp MinElute в микроцентрифуге**

- Закройте крышку пробирки с колонкой QIAamp MinElute, прежде чем разместить колонку в микроцентрифуге. Процентрифугируйте в течение необходимого периода времени.
- Достаньте колонку QIAamp MinElute и промывочные пробирки из микроцентрифуги.
- Поместите колонку QIAamp MinElute в новую промывочную пробирку. Утилизируйте фильтрат и промывочную пробирку. Необходимо отметить, что фильтрат может содержать опасные отходы и должен соответствующим образом утилизироваться.
- Открывайте только одну колонку QIAamp MinElute за раз. Примите меры для того, чтобы предотвратить образование аэрозолей.

Для параллельной обработки большого количества образцов мы рекомендуем устанавливать промывочные пробирки на штативе таким образом, чтобы можно было перенести колонки QIAamp MinElute после центрифугирования. Использованные промывочные пробирки, содержащие фильтрат, должны утилизироваться, а новые промывочные пробирки, содержащие колонки QIAamp MinElute, могут устанавливаться непосредственно в центрифугу.

### **Подготовка реагентов и буферов**

- Подготовка РНК. При работе с РНК необходимо соблюдать оперативность на всех этапах процедуры (см. «Предупреждения и меры предосторожности»).
- Приготовление протеиназы QIAGEN



Добавьте все содержимое пробирки с растворителем протеиназы (PS) в пробирку с лиофилизированной протеиназой QIAGEN (QP) и тщательно перемешайте. Для того, чтобы предотвратить образование пены, перемешивайте содержимое, переворачивая пробирку несколько раз. Убедитесь в том, что протеиназа QIAGEN (QP) полностью растворилась. Протеиназа QIAGEN (QP), восстановленная в растворителе протеиназы (PS), остается стабильной в течение одного года при хранении при температуре 2-8°C, но не дольше даты окончания срока годности набора, указанного на этикетке. Следует избегать хранения восстановленной протеиназы QIAGEN при комнатной температуре продолжительный период времени.

**ВАЖНО:** Не добавляйте Протеиназу QIAGEN (QP) непосредственно в буфер AL.\*

■ Добавление носителя РНК в буфер AL\*

Добавьте 310 мкл буфера AVE в пробирку, содержащую 310 мкг лиофилизированного носителя РНК для того, чтобы получить раствор с концентрацией 1 мкг/мкл. Тщательно растворите носитель РНК, разделите его на равные аликвоты и храните при температуре от -15°C до -25°C. Не размораживайте/замораживайте аликвоты носителя РНК более 3 раз.

**ВАЖНО:** Носитель РНК не растворяется в буфере AL. Его следует развести в буфере AVE, а только затем добавить в буфер AL.

\*Содержит хаотропную соль. Соблюдайте меры предосторожности и надевайте перчатки во время работы. Не совместим с дезинфицирующими средствами, содержащими отбеливатель. См. раздел «Предупреждения и меры предосторожности»

Рассчитайте объем смеси буфера AL и носителя РНК, необходимого для одной партии исследуемых образцов, выбрав количество образцов, которое должно одновременно обрабатываться, из таблицы 1 ниже. Если используется большое количество образцов, объемы можно рассчитать следующим образом:

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

$$y \text{ мл} \times 28 \text{ мкл/мл} = z \text{ мкл}$$

Где: n = количество образцов, которые должны обрабатываться одновременно

y = рассчитанный объем буфера AL

z = количество носителя РНК в буфере AVE, которое должно добавляться в буфер AL.

Аккуратно перемешайте, переворачивая пробирки 10 раз. Для того, чтобы избежать пенообразования, не встряхивайте раствор.

Таблица 1. Объемы буфера AL и раствора носителя РНК в буфере AVE, необходимые для выделения вирусных ДНК и РНК с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit.

| Количество образцов | Объем буфера AL (мл) | Объем носителя РНК в буфере AVE (мкл) | Кол-во образцов | Объем буфера AL (мл) | Объем носителя РНК в буфере AVE (мкл) |
|---------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------------------------|
| 1                   | 0,22 мл              | 6,2 мкл                               | 13              | 2,86 мл              | 80,1 мкл                              |
| 2                   | 0,44 мл              | 12,3 мкл                              | 14              | 3,08 мл              | 86,3 мкл                              |
| 3                   | 0,66 мл              | 18,5 мкл                              | 14              | 3,30 мл              | 92,4 мкл                              |
| 4                   | 0,88 мл              | 24,6 мкл                              | 16              | 3,52 мл              | 98,6 мкл                              |
| 5                   | 1,10 мл              | 30,8 мкл                              | 17              | 3,74 мл              | 104,7 мкл                             |
| 6                   | 1,32 мл              | 37,0 мкл                              | 18              | 3,96 мл              | 110,9 мкл                             |
| 7                   | 1,54 мл              | 43,1 мкл                              | 19              | 4,18 мл              | 117,0 мкл                             |
| 8                   | 1,76 мл              | 49,3 мкл                              | 20              | 4,40 мл              | 123,2 мкл                             |
| 9                   | 1,98 мл              | 55,4 мкл                              | 21              | 4,62 мл              | 129,4 мкл                             |
| 10                  | 2,20 мл              | 61,6 мкл                              | 22              | 4,84 мл              | 135,5 мкл                             |
| 11                  | 2,42 мл              | 67,8 мкл                              | 23              | 5,06 мл              | 141,7 мкл                             |
| 12                  | 2,64 мл              | 73,9 мкл                              | 24              | 5,28 мл              | 147,8 мкл                             |

**ВАЖНО:** Процедура подготовки образцов оптимизирована для 5,6 мкг носителя РНК на образец. Если меньшее количество носителя РНК является оптимальным для вашей системы



амплификации, переносите только необходимое количество носителя РНК в пробирки, содержащие буфер AL. На каждый микрограмм носителя РНК, необходимого для подготовки образца, необходимо добавлять 5 мкл растворенного в буфере AVE носителя РНК на миллилитр буфера AL. Использование менее 5.6 мкг носителя РНК для одного образца должно подтверждаться для каждого отдельного типа образца и анализа.

### **Буфер AW1**

Перед использованием добавьте 25 мл этанола (96-100%) во флакон, содержащий 19 мл концентрата буфера AW1. Пометьте этикетку для того, чтобы указать, что этанол уже добавлялся. Храните восстановленный буфер AW1 при комнатной температуре (15-25°C). Разбавленный буфер AW1 остается стабильным в течение года, но не дольше срока годности набора, указанного на упаковке.

**ВАЖНО:** Всегда перемешивайте восстановленный буфер AW1 перед использованием, встряхивая его.

### **Буфер AW2**

Добавьте 30 мл этанола (96-100%) во флакон, содержащий 13 мл концентрата буфера AW2. Пометьте этикетку для того, чтобы указать, что этанол уже добавлялся. Храните растворенный буфер AW2 при комнатной температуре (15-25°C). Разбавленный буфер AW2 остается стабильным в течение года, но не дольше срока годности набора, указанного на упаковке.

**ВАЖНО:** Всегда перемешивайте восстановленный буфер AW2 перед использованием, встряхивая его.

### **Элюирование нуклеиновых кислот**

Температура элюирующего буфера перед использованием должна быть доведена до комнатной температуры.

#### **14.1. Протокол: Выделение вирусной нуклеиновой кислоты из плазмы и сыворотки**

Данный протокол описывает процедуру выделения вирусной нуклеиновой кислоты из 200 мкл плазмы или сыворотки с использованием набора реагентов QIAamp DSP Virus Spin Kit и микроцентрифуги. Для того, чтобы ознакомиться с процедурой автоматического выделения вирусной нуклеиновой кислоты, используя набор реагентов QIAamp DSP Virus Spin Kit и станцию QIAcube (Приложение А), смотрите инструкцию по эксплуатации станции QIAcube и соответствующий протокол.

#### **Действия, которые необходимо выполнить перед началом процедуры**

- Обработка в центрифуге должна осуществляться при комнатной температуре (15-25°C).
- Доведите температуру образцов до комнатной (15-25°C).
- Доведите температуру буфера AVE до комнатной с целью элюирования на этапе 14.
- Установите нагревательный блок на температуру 56°C (+ 3°C) с целью его использования на этапе 4.
- Убедитесь в том, что буфер AW1, буфер AW2 и Протеиназа QIAGEN (QP) подготовлены в соответствии с инструкциями в разделе «Подготовка реагентов и буферов».
- Добавляйте носитель РНК, восстановленный в буфере AVE, в буфер AL в соответствии с инструкциями в разделе «Подготовка реагентов и буферов».

#### **Процедура**

1. Добавьте 25 мкл Протеиназы QIAGEN (QP) в пробирку для лизиса (LT).

**ВАЖНО:** Ознакомьтесь с разделом «Подготовка реагентов и буферов» для того, чтобы правильно провести ресуспендирование Протеиназы QIAGEN (QP) в растворителе протеиназы (PS).

2. Добавьте 200 мкл плазмы/сыворотки в пробирку для лизиса (LT).

Если объем образца меньше 200 мкл, добавьте раствор 0,9% хлорида натрия для того, чтобы довести объем образца до 225 мкл.

3. Добавьте 200 мкл буфера AL. Закройте крышку и перемешайте в вортексе > 15 секунд.



Для того, чтобы обеспечить эффективный лизис, необходимо тщательно перемешать буфер AL и образец, получив однородный раствор.

**ВАЖНО:** Не добавляйте Протеиназу QIAGEN (QP) непосредственно в буфер AL.

4. Проинкубируйте при температуре 56°C (+ 3°C) в течении 15 минут (+1 ) в нагревательном блоке.

5. Центрифугируйте пробирки для лизиса (LT) в течение  $\geq 5$  секунд для того, чтобы удалить капли с внутренней части крышки.

6. Добавьте 250 мкл этанола (96-100%) в образец. Закройте крышку и перемешайте в вортексе в течение  $> 15$  секунд. Проинкубируйте лизат с этанолом в течение 5 минут ( $\pm 30$  секунд) при комнатной температуре (15-25°C).

**ВАЖНО:** Если окружающая температура превышает 25°C, следует охладить этанол на льду перед добавлением в лизат.

7. Процентрифугируйте пробирки в течение  $\geq 5$  секунд для того, чтобы удалить капли с внутренней части крышки.

8. Аккуратно перенесите весь лизат, полученный на этапе 7, в колонку QIAamp MinElute, не касаясь края колонки. Закройте крышку и процентрифугируйте при 6000 x g в течение  $> 1$  минуты. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую 2 мл промывочную пробирку (WT) и утилизируйте пробирку, содержащую фильтрат.

Если после центрифугирования лизат не прошел через колонку полностью, проведите повторное центрифугирование при большей скорости, пока колонка QIAamp MinElute не будет пустой.

9. Аккуратно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл буфера AW1, не касаясь края колонки. Закройте крышку и процентрифугируйте при 6000 x g в течение  $> 1$  минуты. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую 2 мл промывочную пробирку (WT) и утилизируйте промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

10. Аккуратно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл буфера AW2, не касаясь края колонки. Закройте крышку и процентрифугируйте при 6000 x g в течение  $> 1$  минуты. Поместите колонку QIAamp MinElute в чистую 2 мл промывочную пробирку (WT) и утилизируйте промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

11 Аккуратно откройте колонку QIAamp MinElute и добавьте 500 мкл этанола (96-100%), не касаясь края колонки. Закройте колпачок и процентрифугируйте при 6000 x g в течение  $> 1$  минуты. Удалите промывочную пробирку, содержащую фильтрат.

Попадание этанола в элюат может привести к возникновению проблем при последующих анализах. Некоторые центробежные роторы могут вибрировать, в результате чего этанол может разбрызгаться. При снятии колонки QIAamp MinElute и промывочной пробирки с ротора, необходимо соблюдать аккуратность.

12. Разместите колонку QIAamp MinElute в чистой 2 мл промывочной пробирке (WT). Процентрифугируйте при полной скорости (приблизительно при 20,000 x g) в течение 3 минут (+ 30 секунд) для того, чтобы полностью высушить мембрану.

13. Поместите колонку QIAamp MinElute в новую 2 мл промывочную пробирку (WT), откройте крышку и проинкубируйте при температуре 56°C (+3°C) в течение 3 минут ( $\pm 30$  секунд) для того, чтобы полностью высушить мембрану.

Данное действие необходимо для того, чтобы испарилась оставшаяся жидкость.

14. Поместите колонку QIAamp MinElute в пробирку для элюирования (ET) и утилизируйте промывочную пробирку. Аккуратно откройте крышку колонки QIAamp MinElute и разместите 20-150 мкл буфера AVE по центру мембраны. Закройте крышку и проинкубируйте при комнатной температуре в течение 5 минут. Процентрифугируйте на полной скорости (приблизительно при 20, 000 x g) в течение  $> 1$  минуты.

**ВАЖНО:** Убедитесь в том, что температура элюирующего буфера равна комнатной температуре. Если элюирование осуществляется в небольших объемах ( $< 50$  мкл), элюирующий буфер должен размещаться по центру мембраны с целью полного элюирования связанных ДНК и РНК.



Элюирующий объем может быть скорректирован в зависимости от требований последующих анализов. Учитывайте, что объем элюата будет приблизительно на 5 мкл меньше объема элюирующего буфера, нанесенного на колонку.

## **15. Контроль качества**

В соответствии с ISO-сертифицированной системой управления качеством QIAGEN каждая партия набора QIAamp DSP Virus Spin Kit проходит испытание на соответствие установленным спецификациям для обеспечения постоянного качества продукции.

## **16. Эксплуатационные характеристики**

### **16.1. Линейность**

Оценка линейности проводилась путем тестирования рабочих стандартов вируса гепатита А и парвовируса В 19 в различных концентрациях (от 1 до 6 lg для вируса гепатита А и от 1,3 до 7,3 lg для парвовируса В 19). Данные образцы тестировались с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit методом ПЦР в режиме реального времени. Те же самые образцы тестировались методом ПЦР в режиме реального времени с использованием эталонного метода подготовки образца BioRobot 9604. Результаты демонстрируют сопоставимую линейность между методами пробоподготовки. Средний титр и коэффициенты вариации каждого этапа подготовки также сопоставимы.

### **16.2. Предел обнаружения**

Предел обнаружения вируса гепатита А для набора QIAamp DSP Virus Spin Kit был определен в 8,84 МЕ/мл. Предел обнаружения парвовируса В 19 для набора QIAamp DSP Virus Spin Kit был определен в 14,97 МЕ/мл. Чувствительность набора QIAamp DSP Virus Spin Kit, для обоих вирусов была определена как превышающая чувствительность BioRobot 9604 приблизительно в 2 раза.

### **16.3. Прецизионность и воспроизводимость**

В рамках исследования параметры точности испытывались по двум параметрам: воспроизводимость и прецизионность. Испытания проводились с использованием ПЦР наборов реагентов artus HCV RG RT-PCR Kit и artus HBV RG PCR Kit, образцов плазмы и сыворотки со средним содержанием вируса гепатита HBV/HCV в концентрации  $1 \times 10^4$  МЕ/мл при использовании протокола ручного лизиса с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit и частично стандартному протоколу для автоматической станции QIAcube в следующих комбинациях:

- Протокол извлечения из большого объема образца (плазма)
- Протокол извлечения из большого объема образца (сыворотка)
- Протокол извлечения из малого объема образца (плазма)
- Протокол извлечения из малого объема образца (сыворотка)

Были соблюдены все критерии приемлимости для каждого из параметров (воспроизводимость и прецизионность) и общей точности - коэффициент вариации (%) и общая точность (%) были  $< 45\%$ .

Использование различных протоколов, исходных объемов образцов и целевых аналитов продемонстрировало сопоставимые результаты в отношении определения вирусной нагрузки, а также анализа точности определения вируса гепатита HCV и HBV.

### **16.4. Перекрестная реактивность. Точность**

Была оценена возможность перекрёстного загрязнения при использовании высоко положительных образцов ( $5.00 \times 10^7$  МЕ/мл вируса гепатита В) и отрицательных образцов при выделении ДНК из образца с помощью набора QIAamp DSP Virus Spin Kit при ручном выделении в комбинации с набором реагентов artus HBV RG PCR и амплификатором Rotor-Gene Q.

Все положительные образцы были определены положительными, а все отрицательные образцы были определены отрицательными в целевом (Green) канале. Данное исследование

продemonстрировало, что процесс очистки и выделения ДНК вируса гепатита В, не приводит к перекрёстному загрязнению.

Результат количественного определения всех положительных образцов не превышал 0,22 Lg от номинального значения  $5.00 \times 10^7$  МЕ/мл, что соответствует критериям приемлимости, допускающим погрешность в 0,5 Lg.

#### 16.5. Интерферирующие вещества

Образцы, содержащие повышенные уровни эндогенных ингибиторов: гемоглобина (в высокой концентрации), триглицеридов и билирубина, не препятствуют обнаружению низкой концентрации вируса гепатита С ( $3 \times \text{LOD}$  714 МЕ/мл) и средней концентрации вируса гепатита С ( $1 \times 10^4$  МЕ/мл) набором artus® HCV RG PCR при выделении НК с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit.

#### 16.6. Клиническая специфичность

При проведении тестов на ВИЧ и вирус гепатита В была продемонстрирована 100% клиническая специфичность при использовании набора QIAamp DSP Virus Spin Kit и амплификатора Rotor-Gene Q для ПЦР ВИЧ в режиме реального времени и системы LightCycler для ПЦР вируса гепатита В в качестве последующего анализа.

### 17. Маркировка

На упаковке и этикетках могут присутствовать следующие обозначения:

|                                                                                     |                                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
|    | Содержит реагенты, достаточные для тестов <N>                   |
|    | Смотрите инструкции по применению                               |
|   | Использовать до                                                 |
|  | Для диагностики In vitro                                        |
|  | Каталожный номер                                                |
|  | Номер партии                                                    |
|  | номер материала                                                 |
|  | Компоненты                                                      |
|  | Объем                                                           |
|  | Диапазон температур                                             |
|  | Производитель                                                   |
|  | По прибытии                                                     |
|  | Открыть при доставке; храните колонки QIAamp MinElute при 2-8°C |
|  | Запишите текущую дату после добавления этанола во флакон        |
|  | Добавление                                                      |
|  | Содержит                                                        |
|  | Лиофилизированный                                               |



|                                                                                   |                                               |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>RCNS</b>                                                                       | Восстановить в                                |
| <b>EtOH</b>                                                                       | Этанол                                        |
| <b>GuHCl</b>                                                                      | Гуанидин гидрохлорид                          |
| <b>MALEIC ACID</b>                                                                | Малеиновая кислота                            |
| <b>SUBT</b>                                                                       | Субтилизин                                    |
| <b>GTIN</b>                                                                       | Глобальный торговый номер                     |
|  | Внимание!                                     |
| Rn                                                                                | R - версия инструкции, а n - номер пересмотра |
| →                                                                                 | Приводит к                                    |

## 18.Требование к охране окружающей среды.

Медицинское изделие при использовании, транспортировке и хранении, не оказывает негативного воздействия на человека и окружающую среду.

## 19.Утилизация

Чтобы избежать возможного загрязнения окружающей среды, изделие с истекшим сроком годности, отходы использованных реагентов, а также, в случае видимых повреждений индивидуальной упаковки, изделие должно утилизироваться местными публично-правовыми организациями, в соответствии с требованиями местных нормативно-правовых актов и правилами утилизации в данном регионе.

На территории Российской Федерации набор QIAamp DSP Virus Spin Kit должен утилизироваться в соответствии с нормативными требованиями для отходов класса Б (как материалы и инструменты, предметы, загрязненные кровью или другими биологическими жидкостями) – после химических методов обеззараживания и аппаратных способов обеззараживания с применением физических методов в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами в соответствии с СанПиН 2.1.3684-21).

## 20.Контактная информация

Техническую поддержку и дополнительную информацию можно получить в центре технической поддержки по ссылке [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), позвонив по номеру 00800-22-44-6000, или обратившись в отдел технической поддержки КАЙДЖЕН или к местным дистрибьюторам (см. на сайте [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## 21.Гарантийные обязательства

Компания QIAGEN GmbH (КАЙДЖЕН ГмбХ) принимает на себя гарантийные обязательства в отношении медицинского изделия по отсутствию дефектов и соответствии заявленным производителем характеристикам в течение всего срока годности, при соблюдении условий, указанных в инструкции по применению.

Производитель не несёт ответственности за повреждения или несчастные случаи в результате неправильного использования, ошибки пользователя или внешних чрезвычайных ситуаций. По вопросам качества продукции обращайтесь к уполномоченному представителю производителя.

## 22. Уполномоченный представитель производителя на территории Российской Федерации:

Общество с ограниченной ответственностью "Кайджен РУС" (ООО "Кайджен РУС")  
Россия, 123112, г. Москва, Пресненская набережная, дом 6, строение 2, этаж 50, помещение 5001

Номер телефона: +7 499 703 15 56

Адрес электронной почты: qiagenrus@qiagen.com

### Приложение А: Автоматизированный процесс выделения с использованием станции QIAcube

Выделение и очистка вирусных нуклеиновых кислот с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit может быть полностью автоматизирована на оборудовании QIAcube. Инновационная автоматическая станция для выделения нуклеиновых кислот QIAcube использует современную технологию для обработки центрифужных колонок QIAamp MinElute, обеспечивая непрерывную автоматизированную подготовку образцов. Подготовка образцов с использованием станции QIAcube включает те же этапы, что и ручная подготовка (лизис, связывание, промывка и элюирование) и позволяет использовать набор QIAamp DSP Virus Spin Kit для высококачественного выделения вирусных нуклеиновых кислот.

При автоматической обработке образцов в станции QIAcube с использованием набора QIAamp DSP Virus Spin Kit может оказаться так, что прибор обработает менее 50 образцов крови из-за мертвых объемов, испарения и дополнительного потребления реагентов автоматическим дозатором. Компания QIAGEN гарантирует обработку 50 образцов только при ручном использовании набора QIAamp DSP Virus Spin Kit.

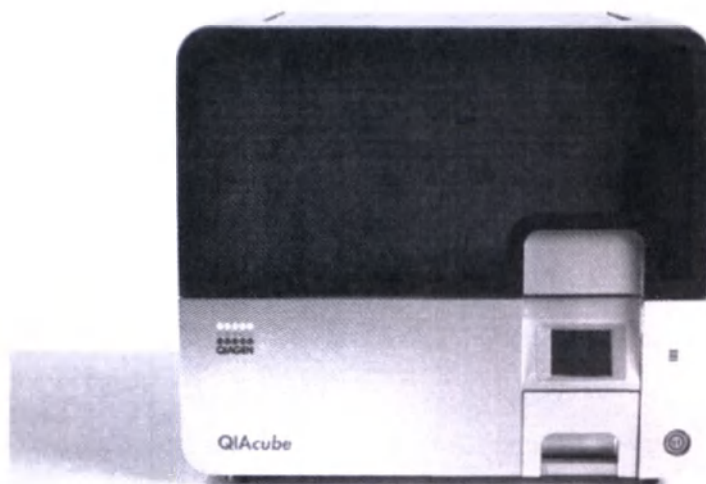


Рисунок 1. Станция QIAcube

#### Редакция документа

| Дата          | Изменения              |
|---------------|------------------------|
| R6, март 2015 | Изменения в маркировке |



«КАЙДЖЕН ГмбХ»

Кайджен штрассе 1, 40724 Хильден  
Германия

Номер по реестру 1198/2021 М

Настоящим я удостоверяю, что подписи и печати на прилагаемом документе подтвердил в моем присутствии

г-н д-р Бартхолд Пиэнинг, род. 19 ноября 1958 г.

служебный адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,

лично мне известный.

Г-н д-р Бартхолд Пиэнинг действует не от своего имени, а от имени компании

«КАЙДЖЕН ГмбХ»

(Адрес: Кайджен штрассе 1 в 40724 Хильдене,

После сверки с электронным торговым реестром Дюссельдорфа, запись под № 45822, я удостоверяю, что

- в него внесена компания «КАЙДЖЕН ГмбХ» со штаб-квартирой в г. Хильден;
- в нем зарегистрирован г-н Бартхолд Пиэнинг в качестве Управляющего директора, который всегда вправе представлять Компанию единолично или вместе по любому вопросу;
- Г-н д-р Бартхолд Пиэнинг всегда освобожден от ограничений на заключение сделок с самим собой в соответствии с § 181 Гражданского кодекса Германии («ГК»).

Хильден , 9 июня 2021 года

Д-р Никлас Майрозе

Официальный нотариус

Миттельштрассе 36-38, 40721, Хильден, Германия

[Круглая гербовая печать:

Д-р Никлас Майрозе

нотариус в Хильдене]

Текст данного документа перевёл переводчик Сербигешева Ольга Анатольевна.  
Знание иностранного языка подтверждаю. Выполненный перевод является  
правильным, точным и полным.

**ПОДПИСЬ**

Российская Федерация

Город Москва

Двадцать первого июля две тысячи двадцать первого года

Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы, свидетельствую подлинность подписи  
переводчика Сербигешевой Ольги Анатольевны.

Подпись сделана в моем присутствии.

Личность подписавшего документ установлена.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021- 10-1843

Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.

**ПОДПИСЬ**

Гербовая печать  
нотариуса г.Москвы  
Точкина Д.В

Д.В. Точкин

Всего прошнуровано, пронумеровано  
и скреплено печатью 22 лист(а)(ов)

Нотариус

**ПОДПИСЬ**

Российская Федерация  
Город Москва

Двадцать первого июля две тысячи двадцать первого года  
Я, Точкин Дмитрий Валерьевич, нотариус города Москвы,  
свидетельствую верность копии с представленного мне документа.

Зарегистрировано в реестре: № 77/2079-н/77-2021- 10-1844  
Уплачено за совершение нотариального действия: 400 руб.

Д.В. Точкин

Всего прошито, пронумеровано, скреплено  
печатью 23 лист(а)(ов)

Нотариус