
Grudzień 2017

Karta protokołu QIASymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP i Tissue_HC_200_V7_DSP

Niniejszy dokument to *karta protokołu QIASymphony SP Tissue_LC_200_V7_DSP I Tissue_HC_200_V7_DS R3* dla zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit, wersja 1.

Informacje ogólne

Zestaw QIASymphony DSP DNA Kit jest przeznaczony do diagnostyki in vitro.

Niniejsze protokoły służą do oczyszczania całkowitego DNA z tkanek i tkanek utrwalonych w formalinie, zatopionych w parafinie (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) za pomocą aparatu QIASymphony SP i zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

W zależności od typu próbki zalecamy postępowanie zgodnie z protokołem niskiej zawartości (low content, LC) lub wysokiej zawartości (high content, HC). W przypadku przetwarzania tkanek za pomocą protokołu wysokiej zawartości otrzymywany jest większy uzysk DNA, natomiast jeśli wymagane jest duże stężenie DNA, można użyć protokołu niskiej zawartości w połączeniu z małą objętością elucji (50 µl). W przypadku tkanki FFPE zalecamy stosowanie protokołu niskiej zawartości.

Protokół niskiej zawartości

Zestaw	Zestaw QIASymphony DSP DNA Mini Kit (nr kat. 937236)
Materiał próbki	Tkanka FFPE i tkanka* W jeden preparat można połączyć do 4 skrawków tkanki FFPE, każdy o grubości do 10 µm, lub 8 skrawków o grubości do 5 µm i polu powierzchni do 250 mm ² .
Nazwa protokołu	Tissue_LC_200_V7_DSP
Domyślny zestaw ustawień kontrolnych badania	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Objętość elucji	50 µl, 100 µl, 200 µl lub 400 µl
Wymagana wersja oprogramowania	Wersja 4.0 lub wyższa

* Informacje na temat próbek tkanki znajdują się w protokole wysokiej zawartości.

Protokół wysokiej zawartości

Zestaw	Zestaw QIASymphony DSP DNA Mini Kit (nr kat. 937236)
Materiał próbki	Tkanka Jeśli informacje o oczekiwanym uzysku nie są dostępne, zalecamy rozpoczęcie od 25 mg materiału próbki. W zależności od otrzymanego uzysku w kolejnych preparatach można zwiększyć rozmiar próbki.
Nazwa protokołu	Tissue_HC_200_V7_DSP
Domyślny zestaw ustawień kontrolnych badania	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Objętość elucji	100 µl, 200 µl lub 400 µl
Wymagana wersja oprogramowania	Wersja 4.0 lub wyższa

Materiały wymagane, ale niedostarczone

Dla wszystkich typów próbek

- Bufor ATL, 4 x 50 ml (nr kat. 939016)
- Aby zminimalizować zawartość RNA: RNaza A wolna od DNaz (roztwór podstawowy o stężeniu 100 mg/ml)

W przypadku tkanki FFPE (deparafinizacja bez ksylenu)

- Roztwór do deparafinizacji (nr kat. 939018)

W przypadku tkanki FFPE (deparafinizacja za pomocą ksylenu)

- Ksylen (99–100%)
- Etanol (96–100%)*

Szuflada „Sample” (Próbka)

Typ próbki	Tkanka FFPE i tkanka
Wejściowa objętość próbki	220 µl (wymagana na próbkę, na protokół) [†]
Przetwarzana objętość próbki	200 µl
Probówki pierwotne	nd.
Probówki dodatkowe	Więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Wkłady	Zależą od typu używanej probówki; więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] W przypadku obu protokołów, protokołu wysokiej i niskiej zawartości, system nie rozpozna, czy objętość próbki jest mniejsza niż 220 µl, ponieważ podczas przenoszenia próbki nie jest wykrywany poziom płynu. Z tego względu należy upewnić się, że wejściowa objętość próbki jest równa 220 µl.

nd. = nie dotyczy.

Szuflada „Reagents and Consumables” (Odczynniki i materiały eksploatacyjne)

Pozycja A1 i/lub A2	Kartridż z odczynniki
Pozycja B1	nd.
Uchwyt na statyw na końcówki 1–17	Jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl lub 1500 µl
Uchwyt na opakowania jednostkowe 1–4	Opakowania jednostkowe zawierające kartridże sample prep lub zamknięcia 8-szyftowe

* Nie używać spirytusu denaturowanego, który zawiera dodatkowe substancje, takie jak metanol lub metyloetyloketon.

nd. = nie dotyczy.

Szuflada „Waste” (Odpady)

Uchwyt na opakowania jednostkowe 1–4	Puste opakowania jednostkowe
Uchwyt na worek na odpady	Worek na odpady
Uchwyt na butlę na odpady płynne	Pusta butla na odpady płynne

Szuflada „Eluate” (Eluat)

Statyw elucji (zalecamy używanie gniazda 1, pozycji chłodzenia)	Więcej informacji znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
---	--

Wymagany sprzęt z tworzywa sztucznego

Sprzęt z tworzywa sztucznego	Jedna partia, 24 próbki*	Dwie partie, 48 próbek*	Trzy partie, 72 próbki*	Cztery partie, 96 próbek*
Jednorazowe końcówki z filtrem, 200 µl [†]	26	50	74	98
Jednorazowe końcówki z filtrem, 1500 µl [†]	72	136	200	264
Kartridże sample prep [§]	21	42	63	84
Zamknięcia 8-sztyftowe [¶]	3	6	9	12

* W przypadku używania mniej niż 24 próbek na jedną partię zmniejsza się liczba jednorazowych końcówek z filtrem wymaganych na cykl.

[†] Statyw na końcówki z filtrem zawiera 32 końcówki z filtrem.

[‡] Liczba wymaganych końcówek z filtrem obejmuje końcówki z filtrem dla 1 skanowania inwentaryzującego na kartridż z odczynnikami.

[§] Opakowanie jednostkowe zawiera 28 kartridży sample prep.

[¶] Opakowanie jednostkowe zawiera dwanaście zamknięć 8-sztyftowych.

Uwaga: Podane liczby końcówek z filtrem mogą różnić się od liczb wyświetlanych na ekranie dotykowym w zależności od ustawień. Zalecamy załadowanie maksymalnej możliwej liczby końcówek.

Objętość elucji

Objętość elucji jest wybierana na ekranie dotykowym. W zależności od typu próbki i zawartości DNA końcowa objętość eluatu może być mniejsza o maksymalnie 15 µl od wybranej objętości. Ze względu na możliwość występowania różnic w objętości eluatu podczas korzystania z systemu zautomatyzowanej konfiguracji badania, który nie weryfikuje objętości eluatu przed jego przeniesieniem, zalecamy sprawdzenie rzeczywistej objętości eluatu. Elucja w mniejszych

objętościach zwiększa końcowe stężenie DNA, ale nieznacznie zmniejsza uzysk. Zalecamy stosowanie objętości elucji odpowiedniej do zaplanowanych dalszych procedur analitycznych.

Przygotowanie materiału próbki

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (Safety Data Sheet, SDS) uzyskanymi od producentów poszczególnych produktów.

Ważna informacja przed rozpoczęciem

- Cząsteczki magnetyczne QIASymphony mogą spowodować jednoczesne oczyszczenie RNA i DNA, jeśli oba kwasy nukleinowe są obecne w próbce. W celu zminimalizowania zawartości RNA w próbce w etapie wskazanym w odpowiednim protokole wstępnego przygotowania należy dodać do próbki RNazę A.

Czynności do wykonania przed rozpoczęciem

- Sprawdzić, czy w buforze ATL nie jest obecny biały osad. W razie potrzeby, aby rozpuścić osad, inkubować przez 30 minut w temperaturze 37°C, od czasu do czasu wstrząsając.
- Ustawić aparat ThermoMixer® lub inkubator z wytrząsaniem na temperaturę wymaganą dla odpowiedniej procedury wstępnego przygotowania.*

Tkanki

W celu oczyszczenia DNA można użyć świeżej i zamrożonej tkanki. Uzysk i jakość DNA będą zależeć od typu, źródła i warunków przechowywania tkanki. Świeżą tkankę można pociąć na małe kawałki i przed przetworzeniem przechowywać w temperaturze -20°C lub -80°C. Na ogół zalecamy stosowanie protokołu wysokiej zawartości, za pomocą którego otrzymywany jest większy uzysk DNA. Protokół niskiej zawartości, w połączeniu z objętością elucji 50 µl, jest zalecany, wyłącznie jeśli do dalszych analiz wymagane są duże stężenia DNA. Jeśli informacje o oczekiwanym uzysku nie są dostępne, zalecamy rozpoczęcie od 25 mg materiału próbki, stosując protokół wysokiej zawartości i objętość elucji 200 µl. W zależności do otrzymanego uzysku w kolejnych preparatach można zwiększyć rozmiar próbki lub zmniejszyć objętość elucji. Należy być świadomym tego, że nałożenie zbyt dużej ilości preparatów przy małych objętościach

* Upewnić się, że aparaty były regularnie sprawdzane, konserwowane i kalibrowane zgodnie z wytycznymi producenta.

elucji może spowodować przeniesienie cząsteczek magnetycznych do eluatu i negatywnie wpłynąć na czystość DNA i dalsze analizy.

Protokół wstępnego przygotowania tkanki

1. Przenieść próbkę tkanki do probówki mikrowirówkowej o pojemności 2 ml (niedołączona do zestawu).
2. Dodać 220 µl buforu ATL.
3. Dodać 20 µl proteinazy K i wymieszać, ostukując probówkę.
Uwaga: Użyć proteinazy K ze statywu na enzymy zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
4. Umieścić probówkę w aparacie ThermoMixer lub inkubatorze z wytrząsaniem i inkubować w temperaturze 56°C z wytrząsaniem przy 900 rpm do momentu całkowitej lizy tkanki.
Uwaga: Czas trwania lizy różni się w zależności od typu przetwarzanej tkanki.
W przypadku większości tkanek liza zajmuje 3 godziny. Jeśli liza nie zaszła całkowicie w ciągu 3 godzin, na co wskazuje obecność nierozpuszczalnego materiału lub lizatów o wysokiej lepkości, można wydłużyć czas trwania lizy lub usunąć nierozpuszczalny materiał poprzez wirowanie w sposób opisany w etapie 6. Możliwe jest prowadzenie lizy przez noc; nie ma to wpływu na preparat.
5. Aby zminimalizować zawartość RNA w próbce, przed przejściem do etapu 6 dodać 4 µl RNazy A (100 mg/ml) i inkubować przez 2 minuty w temperaturze pokojowej (15–25°C).
6. Zhomogenizować próbkę, kilka razy pipetując w górę i w dół.
Uwaga: Jeśli wciąż obecne są fragmenty nierozpuszczalnego materiału, wirować przy 3000 x g przez 1 minutę.
7. Ostrożnie przenieść 220 µl supernatantu do probówek, które są zgodne z nośnikiem próbek aparatu QIASymphony SP.
Pełna lista zgodnych probówek znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphanthbooks. Zalecamy używanie probówek o pojemności 2 ml (np. Sarstedt® nr kat. 72.693 lub 72.608).

Tkanka FFPE

Standardowe procedury utrwalania w formalinie i zatapiania w parafinie zawsze powodują znaczną fragmentację kwasów nukleinowych. Aby ograniczyć fragmentację DNA, należy:

- Utrwalać próbki tkanki w 4–10-procentowej formalinie, możliwie jak najszybciej po pobraniu chirurgicznym.

- Utrwalać przez 14–24 godzin (dłuższy czas utrwalania prowadzi do większej fragmentacji DNA, co powoduje słabą wydajność dalszych analiz).
- Przed zatopieniem dokładnie odwodnić próbki (pozostałości formaliny mogą hamować trawienie proteinazą K).

Materiałem początkowym do oczyszczenia DNA powinny być świeżo odcięte skrawki tkanki FFPE. W jeden preparat można przetworzyć do 4 skrawków, każdy o grubości do 10 µm, lub 8 skrawków o grubości do 5 µm i powierzchni do 250 mm². Jeśli informacje o charakterze materiału początkowego nie są dostępne, zalecamy rozpoczęcie od maksymalnie 3 skrawków na jeden preparat. W zależności od uzysku i czystości DNA w kolejnych preparatach będzie można użyć do 8 skrawków.

Uwaga: Protokoły tkanki FFPE są zaprojektowane w taki sposób, aby jednocześnie oczyszczać tylko małe ilości RNA. Spowoduje to zmniejszoną wartość pomiaru fotometrycznego w porównaniu do wartości uzyskanych za pomocą ręcznego zestawu QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Protokół wstępnego przygotowania tkanki FFPE

Metoda 1: deparafinizacja za pomocą roztworu do deparafinizacji

1. Używając skalpela, przyciąć nadmiar parafiny z bloczka próbki.
2. Odciąć do 4 skrawków o grubości 10 µm lub do 8 skrawków o grubości 5 µm.
Uwaga: Jeśli powierzchnia próbki została narażona na powietrze, odrzucić pierwsze 2–3 skrawki.
3. Niezwłocznie umieścić skrawki w probówce Sarstedt o pojemności 2 ml (brak w zestawie, nr kat. 72.693 lub 72.608) zgodnej z nośnikiem próbek aparatu QIASymphony SP.
4. Dodać 200 µl buforu ALT na skrawki.
5. Dodać 20 µl proteinazy K.
Uwaga: Użyć proteinazy K ze statywu na enzymy zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Dodać 160 µl lub 320 µl roztworu do deparafinizacji (patrz poniższa tabela) i wymieszać poprzez wytrząsanie.

Grubość skrawków	Liczba skrawków	Objętość roztworu do deparafinizacji
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

- Umieścić próbkę w aparacie ThermoMixer lub inkubatorze z wytrząsaniem i inkubować w temperaturze 56°C przez 1 godzinę z wytrząsaniem przy 1000 rpm do momentu całkowitej lizy tkanki.

Uwaga: Czas trwania lizy różni się w zależności od typu przetwarzanej tkanki.

W przypadku większości tkanek liza zajmuje 1 godzinę. Jeśli liza nie zaszła całkowicie w ciągu 1 godziny, na co wskazuje obecność nierozpuszczalnego materiału, można wydłużyć czas trwania lizy lub usunąć nierozpuszczalny materiał poprzez wirowanie w sposób opisany w etapie 10. Możliwe jest prowadzenie lizy przez noc; nie ma to wpływu na preparat.

- Inkubować w temperaturze 90°C przez 1 godzinę.

Uwaga: Inkubacja w temperaturze 90°C w buforze ALT częściowo odwraca modyfikację kwasów nukleinowych spowodowaną przez formaldehyd. Dłuższy czas inkubacji lub wyższa temperatura inkubacji może zwiększyć stopień fragmentacji DNA. W przypadku używania tylko jednego bloku grzewczego po zakończeniu inkubacji w temperaturze 56°C pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej, dopóki blok grzewczy nie osiągnie temperatury 90°C.

- Aby zminimalizować zawartość RNA w próbce, przed przejściem do etapu 10 dodać 2 μ l RNazy A (100 mg/ml) do fazy dolnej i inkubować przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Przed dodaniem RNazy A schłodzić próbkę do temperatury pokojowej.
- Wirować przy maksymalnej szybkości przez 1 minutę w temperaturze pokojowej.
- Ostrożnie przenieść próbki (zawierające obie fazy) do nośnika próbek aparatu QIASymphony SP.

Metoda 2: deparafinizacja za pomocą ksylenu

- Używając skalpela, przyciąć nadmiar parafiny z bloczka próbki.
- Odciąć do 4 skrawków o grubości 10 μ m lub do 8 skrawków o grubości 5 μ m.
Uwaga: Jeśli powierzchnia próbki została narażona na powietrze, odrzucić pierwsze 2–3 skrawki.
- Niezwłocznie umieścić skrawki w probówce mikrowirówkowej o pojemności 1,5 lub 2 ml (nie dołączona do zestawu) i dodać 1 ml ksylenu do próbki. Zamknąć wieczko i energicznie wytrząsać przez 10 sekund.
- Wirować przy maksymalnej szybkości przez 2 minuty w temperaturze pokojowej.
- Usunąć supernatant za pomocą pipety. Nie usuwać osadu.
- Dodać 1 ml etanolu (96–100%) do osadu i wymieszać, wytrząsając.

Uwaga: Etanol umożliwia ekstrakcję pozostałości ksylenu z próbki.

7. Wirować przy maksymalnej szybkości przez 2 minuty w temperaturze pokojowej.

8. Usunąć supernatant za pomocą pipety. Nie usuwać osadu.

Uwaga: Ostrożnie usunąć wszelkie pozostałości etanolu, używając cienkiej końcówki do pipety.

9. Otworzyć próbkę i inkubować w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez 10 minut lub do momentu całkowitego wyparowania resztek etanolu.

Uwaga: Inkubację można prowadzić w temperaturze do 37°C.

10. Zawiesić osad w 220 µl buforu ATL.

11. Dodać 20 µl proteiny K i wymieszać, wytrząsając.

Uwaga: Użyć proteiny K ze statywu na enzymy zestawu QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

12. Inkubować w temperaturze 56°C przez 1 godzinę (lub do momentu całkowitej lizy próbki).

Uwaga: Czas trwania lizy różni się w zależności od typu przetwarzanej tkanki. W przypadku większości tkanek liza zajmuje 1 godzinę. Jeśli liza nie zaszła całkowicie w ciągu 1 godziny, na co wskazuje obecność nierozpuszczalnego materiału, można wydłużyć czas trwania lizy lub usunąć nierozpuszczalny materiał poprzez wirowanie w sposób opisany w etapie 16. Możliwe jest prowadzenie lizy przez noc; nie ma to wpływu na preparat.

13. Inkubować w temperaturze 90°C przez 1 godzinę.

Uwaga: Inkubacja w temperaturze 90°C w buforze ALT częściowo odwraca modyfikację kwasów nukleinowych spowodowaną przez formaldehyd. Dłuższy czas inkubacji lub wyższa temperatura inkubacji może zwiększyć stopień fragmentacji DNA. W przypadku używania tylko jednego bloku grzewczego po zakończeniu inkubacji w temperaturze 56°C pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej, dopóki blok grzewczy nie osiągnie temperatury 90°C.

14. Krótco odwirować próbkę w celu usunięcia kropli z wewnętrznej części wieczka.

15. Aby zminimalizować zawartość RNA w próbce, przed przejściem do etapu 16 dodać 2 µl RNazy A (100 mg/ml) i inkubować przez 2 minuty w temperaturze pokojowej.

Przed dodaniem RNazy A schłodzić próbkę do temperatury pokojowej.

16. Ostrożnie przenieść 220 µl lizatu do probówek, które są zgodne z nośnikiem próbek aparatu QIASymphony SP.

Uwaga: Jeśli lizat zawiera niestrawiony materiał, przed przeniesieniem supernatantu do probówek wirować przy maksymalnej szybkości przez 2 minuty. Pełna lista zgodnych probówek znajduje się na stronie www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Zalecamy używanie probówek o pojemności 2 ml (np. Sarstedt, nr kat. 72.693 lub 72.608).

Historia zmian

Historia zmian dokumentu	
R3 12/2017	Aktualizacja dla wersji 5.0 oprogramowania QIASymphony

Aktualne informacje licencyjne oraz wyłączenia odpowiedzialności dla poszczególnych produktów znajdują się w odpowiedniej instrukcji obsługi lub podręczniku użytkownika zestawu QIAGEN®. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie **www.qiagen.com**. Można je także zamówić w serwisie technicznym lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Zastrzeżonych nazw, znaków towarowych itd. wykorzystywanych w niniejszym dokumencie, nawet jeżeli nie zostały oznaczone jako zastrzeżone, nie można uważać za niechronione przepisami prawa.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

Składanie zamówień www.qiagen.com/shop | Pomoc techniczna support.qiagen.com | Strona WWW www.qiagen.com

