

RNeasy[®] DSP FFPE Kit

Leistungsmerkmale

Version 2



In-vitro-Diagnostikum

Zur Verwendung mit dem RNeasy DSP FFPE Kit



73604



R1

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Deutschland

Leistungsmerkmale elektronisch verfügbar unter der Registerkarte „Resources“ (Ressourcen) auf der Produktseite unter www.qiagen.com

Allgemeine Einführung

Das RNeasy DSP FFPE Kit ist für die manuelle Aufreinigung von Gesamt-RNA aus formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) Geweben vorgesehen.

Das Produkt darf nur von Fachpersonal wie z. B. technischen Angestellten und Ärzten, die in der Anwendung molekularbiologischer Techniken geschult sind, verwendet werden. Es arbeitet mit einem optimierten, auf Silika-Spin-Säulen basierendem Protokoll und umfasst eine enzymatische Entfernung von Rest-DNA.

Das RNeasy DSP FFPE Kit isoliert RNA-Moleküle mit einer Länge von mehr als 70 Nukleotiden und ermöglicht die Rückgewinnung nutzbarer RNA-Fragmente für nachgelagerte Anwendungen wie z. B. RT-PCR.

Ausbeute an aufgereinigter RNA

Die grundlegende Leistung des RNeasy DSP FFPE Kit wurde anhand von FFPE-Proben aus 5 verschiedenen menschlichen Geweben (Brust-, Dickdarm-, Lungenkrebs, Melanom und normale Haut, jeweils 20 Proben) beurteilt.

FFPE-Proben können eine beträchtliche Gewebheterogenität aufweisen. Darüber hinaus schwankt die Größe der Gewebeoberfläche bei FFPE-Proben erheblich, was zu Variabilität hinsichtlich der Menge an extrahierter RNA führt. Der Benutzer sollte daher die Anzahl der Schnitte, die Schnittdicke und die Schnittfläche hinsichtlich der jeweils relevanten Probe und der im jeweiligen Labor durchgeführten nachgelagerten Verfahren optimieren.

Wird das Kit als Vorstufe für nachgelagerte QIAGEN® Anwendungen verwendet, sind die Anweisungen in dem entsprechenden Handbuch zu beachten.

Eine unzureichende Entwässerung des Gewebes bei der Vorbereitung des FFPE-Gewebes, die Zugabe von zu viel Paraffin zur Probe im Extraktionsröhrchen, die Verwendung von Ethanol, das nicht den empfohlenen Reinheitsgrad aufweist (d. h. die Verwendung von Ethanol mit nicht für die Molekularbiologie geeigneter Qualität), oder das Vorhandensein von Ethanolrückständen in der Probe kann zu einer suboptimalen Extraktion und zu einer geringen RNA-Menge oder einer reduzierten Leistung bei nachgelagerten Anwendungen führen.

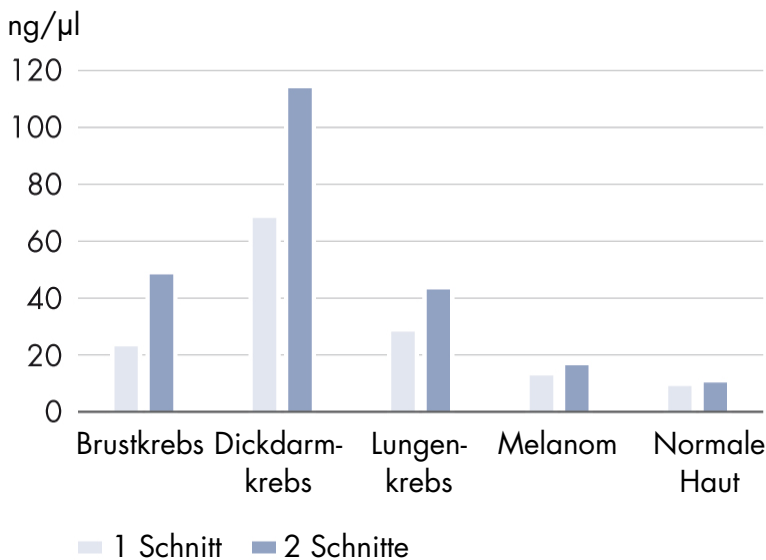


Abbildung 1. RNA-Ausbeuten aus verschiedenen menschlichen Geweben (32 µl Elutionsvolumen).

Nachgelagerte Analyse

Die eluierte RNA kann direkt in nachgelagerten Assays eingesetzt werden. Zur Leistungsbewertung wurden mit dem RNeasy DSP FFPE Kit 10 ng RNA aus 5 verschiedenen menschlichen Geweben (Brust-, Dickdarm-, Lungenkrebs, Melanom und normale Haut; 20 Proben aus je ein oder zwei Schnitten) isoliert und mit einer auf das humane β -Actin-Gen abzielenden RT-PCR validiert. Die Amplifikation war erfolgreich, was zeigt, dass die mit dem RNeasy DSP FFPE Kit isolierte RNA für nachgelagerte Analysen verwendet werden kann.

Der Benutzer sollte Anzahl, Dicke und Oberfläche der Schnitte für die Probe von Interesse sowie alle im Labor verwendeten nachfolgenden Verfahren optimieren oder sich an den Anforderungen des jeweils nachgelagerten Assays orientieren.

	Brustkrebs	Dickdarmkrebs	Lungenkrebs	Melanom	Normale Haut
RT-PCR 1 Schnitt	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 Schnitte	✓	✓	✓	✓	✓

Abbildung 2. Erfolgreiche RT-PCR-Amplifikation von 10 μ m dicken FFPE-Schnitten aus fünf verschiedenen getesteten menschlichen Geweben.

Eluatstabilität

Die Eluatstabilität ist abhängig von Gehalt und Art der mit aufgereinigten Verunreinigungen (je nach Gewebetyp), Elutionsvolumen und Lagerungsbedingungen. Wir empfehlen Benutzern, die Eluatstabilität unter Berücksichtigung ihrer spezifischen Anforderungen selbst zu ermitteln.

Die Eluatstabilität wurde für aus FFPE-Gewebe gewonnene RNA-Proben getestet, die bei -15 bis -30 °C und bei -60 bis -90 °C gelagert wurden. Bis zu 12 Wochen lang wurde kein Abbau beobachtet. Bei Raumtemperatur (18 – 25 °C) gelagerte Eluate waren bis zu 12 Stunden lang stabil. Alle Bedingungen wurden mittels auf das humane β -Actin-Gen abzielender RT-PCR beurteilt.

Wird das Kit als Vorstufe für nachgelagerte QIAGEN Anwendungen verwendet, sind die Anweisungen in dem entsprechenden Kit-Handbuch zu beachten.

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit wurde anhand von FFPE-Proben kernhaltiger humaner Blutzellen ausgewertet. Die Proben wurden mit einem intern validierten Assay auf ein 295 bp großes Fragment des humanen β -Actin-Gens auf einem ABI® 7900 Real-time PCR-Thermocycler getestet.

Für die statistische Analyse wurden 108 Datenpunkte aus drei Extraktionschargen (gleiche(r) Kit-Charge, Bediener und Tag) verwendet. Die statistische Analyse umfasste die Berechnung von Standardabweichung (SD) und Variationskoeffizient (VK) der aus der RT-PCR für β -Actin gewonnenen C_T -Werte. Die SD betrug 1,1 C_T und der VK betrug 4,1 % (Tabelle 1).

Tabelle 1. Wiederholbarkeitsergebnisse

	Wiederholbarkeit		
	Mittelwert C _T	SD	VK (%)
Charge 1	26,64	1,01	3,81
Charge 2	27,51	1,16	4,2
Charge 3	27,23	0,95	3,5
Charge 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde durch Beurteilung von RNA-Extraktionen aus FFPE-Proben kernhaltiger humaner Blutzellen durch verschiedene Bediener, an verschiedenen Tagen oder durch verschiedene Bediener an verschiedenen Tagen bewertet. Die Proben wurden mit einem intern validierten Assay auf ein 295 bp großes Fragment des humanen β -Actin-Gens auf einem ABI 7900 Real-time PCR-Thermocycler getestet. Für die statistische Analyse wurden 108 Datenpunkte aus drei Extraktionschargen für jede Testeinstellung verwendet. Die statistische Analyse umfasste die Berechnung von SD und Variationskoeffizient (VK) der aus der RT-PCR für β -Actin gewonnenen C_T-Werte (Tabelle 2).

Tabelle 2. Reproduzierbarkeitsergebnisse

	Wiederholbarkeit		
	Mittelwert C _T	SD	VK (%)
Verschiedene Bediener	26,92	1,06	3,95
Verschiedene Tage	26,56	1,20	4,53
Verschiedene Bediener und Tage	26,63	1,01	3,78

Linearität der Probeneingabe

Das RNeasy DSP FFPE Kit kann zur Isolierung von RNA aus verschiedenen FFPE-Gewebetypen verwendet werden. Das System wurde für die Verwendung von 1–4 Schnitten aus FFPE-Proben kernhaltiger humaner Blutzellen validiert und zeigte eine lineare Zunahme der RNA-Ausbeute. Der Kunde sollte seinen eigenen Anforderungen entsprechend einen linearen Bereich ermitteln und für den jeweiligen Gebrauch validieren. Es ist davon auszugehen, dass für verschiedene Gewebetypen abhängig von der eingesetzten Gewebemenge, den Gewebeeigenschaften und den nachgelagerten Assays unterschiedliche lineare Bereiche erhalten werden.

Störsubstanzen

Potenzielle Störsubstanzen können unterschiedlicher Herkunft sein, z. B. kann es sich dabei um natürliche Metaboliten handeln, die für Gewebetyp und Organ spezifisch sind, um Metaboliten, die unter pathologischen Bedingungen gebildet werden, um Substanzen, die während der Behandlung des Patienten zugeführt wurden, oder um Substanzen, die vom Patienten selbst aufgenommen wurden. Aufgrund der Komplexität potenzieller Störsubstanzen und der unterschiedlichen Sensitivität der konkreten nachgelagerten Anwendungen empfehlen wir Benutzern, die Auswirkungen von Störsubstanzen auf ihre eigenen Systeme zu bewerten und eine Methode zur Kontrolle von Interferenzen in ihrer spezifischen nachgelagerten diagnostischen Anwendung zu validieren.

Störsubstanzen, die bei Probenverarbeitung und RNA-Extraktion aus Komponenten des RNeasy DSP FFPE Kit entstehen, wurden nicht beobachtet.



















Weitere Informationen über Störsubstanzen in spezifischen nachgelagerten QIAGEN Anwendungen finden Sie in den entsprechenden Kit-Handbüchern.

Kreuzkontamination

Zur Bewertung des Ausmaßes der Kreuzkontamination wurde die Entparaffinierungslösung mit 500 ng Gesamt-RNA aus Blut versetzt, und die Isolierung wurde neben Röhrchen ohne RNA durchgeführt (extraktionsnegative Röhrchen). Die Studie zielte darauf ab, die Situation nachzuahmen, in der Proben während der Extraktion unter Umständen mit anderen Proben mit hohem Gehalt an RNA-Zielmolekülen kreuzkontaminiert werden. Die RNA-Aufreinigung wurde mit einer Reagenzcharge durchgeführt. Das Ausmaß der Kreuzkontamination wurde mittels auf das humane β -Actin-Gen abzielender RT-PCR beurteilt. Die Ergebnisse zeigten im gesamten System keinerlei Kreuzkontamination.

Symbole

Die folgenden Symbole werden in der Gebrauchsanweisung oder auf der Verpackung und Kennzeichnung verwendet:

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Reagenzien ausreichend für <N> Reaktionen
	Verfallsdatum
	Dieses Produkt erfüllt die Anforderungen der europäischen Verordnung 2017/746 über In-vitro-Diagnostika.
	In-vitro-Diagnostikum
	Nach Lieferung
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer (d. h. Kennzeichnung von Komponenten)
	Komponenten (d. h. eine Inhaltsliste)
	Inhalt
	Anzahl (d. h. Gefäße, Flaschen)
	Internationale Artikelnummer
Rn	R = Revision der Gebrauchsanleitung (Handbuch); n = Revisionsnummer
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanweisung beachten
	Vorsicht

Symbol

Bedeutung des Symbols

PROTK

Proteinase K

Sodium azide

Natriumazid

UDI

Unique Device Identifier (eindeutige Geräteerkennung)

Revisionsverlauf des Dokuments

Revision

Beschreibung

R1, Juni 2022

IVDR-Freigabe

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit-Handbuch oder Benutzerhandbuch. QIAGEN Kit-Handbücher und Benutzerhandbücher sind unter www.qiagen.com verfügbar oder können beim Technischen Service von QIAGEN oder Ihrem örtlichen Händler angefordert werden.

Marken: QIAGEN®, Sample to Insight®, RNeasy® (QIAGEN Gruppe); ABI® (Life Technologies Corporation). Eingetragene Namen, Marken usw., die in diesem Dokument verwendet werden, gelten auch ohne ausdrückliche Kennzeichnung als gesetzlich geschützt.

06/2022 HB-3027-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

