

Februarie 2017

Manual de instrucțiuni pentru kitul QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue



Versiunea 1



A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA



R3 1062689RO



Cuprins

Domeniul de utilizare	5
Rezumat și explicații.....	5
Principiul procedurii.....	6
Materiale furnizate	8
Conținutul kitului	8
Materiale necesare care nu sunt furnizate	9
Avertizări și precauții	10
Depozitarea și manipularea reactivilor.....	11
Manipularea și depozitarea probelor	12
Procedură	13
Prepararea soluțiilor tampon	14
Materialul de început.....	15
Procedura de manipulare pentru evitarea contaminării încrucișate.....	16
Centrifugare	17
Procesarea coloanelor QIAamp MinElute în microcentrifugă	17
Eluarea ADN-ului purificat	18
Protocol: Izolarea ADN-ului genomic din secțiunile de țesut FFPE	19
Controlul calității	23
Limitări.....	23
Caracteristici de performanță	24
Simboluri.....	24
Date de contact	26
Informații pentru comandă	27

Domeniul de utilizare

Kitul QIAamp DSP DNA FFPE Tissue este un sistem care folosește tehnologia membranei de siliciu (tehnologia QIAamp) pentru izolarea și purificarea ADN-ului genomic din speciunile biologice fixate în formol, incorporate în parafină (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).

Produsul este destinat utilizatorilor profesioniști, precum tehnicienii și medicii, care au pregătire în tehnicile biologiei moleculare pentru diagnosticare in vitro (in vitro diagnostic, IVD); se folosește pentru prepararea manuală a probelor și nu duce la rezultate cantitative sau calitative.

Rezumat și explicații

Kitul QIAamp DSP DNA FFPE Tissue este folosit pentru purificarea ADN-ului din secțiunile de țesut FFPE. Se folosește microtehnologia QIAamp de purificare a ADN-ului genomic și mitocondrial din volume și dimensiuni mici de probă. Kitul combină proprietățile de a forma selectiv legături ale membranei pe bază de siliciu cu varii volume de eluare.

Condițiile de liză permit ADN-ului genomic să fie purificat eficient din secțiunile de țesut FFPE fără a fi necesară incubarea peste noapte. Incubarea la o temperatură ridicată după ce digestia proteinazei K înlătură parțial legarea încrucișată cu formol a ADN-ului eliberat are potențialul de a îmbunătăți randamentul și performanța ADN-ului în procedurile ulterioare. Remarcați că ADN-ul izolat din probe FFPE are o masă moleculară mai mică decât ADN-ul din probe proaspete sau înghețate. Gradul de fragmentare depinde de tipul și de vechimea probei, precum și de condițiile folosite pentru fixare.

După liza probei, simpla procedură QIAamp DSP DNA FFPE Tissue este potrivită pentru procesarea simultană a mai multor probe.

Validarea performanței sistemului pentru orice proceduri utilizate în laborator care nu fac obiectul studiilor de evaluare a performanței QIAGEN descrise în manual constituie răspunderea utilizatorului.

Principiul procedurii

Procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue cuprinde șase pași (Figura 1):

- Eliminarea parafinei; Parafina se dizolvă în xilen și este îndepărtată
- Liza: Proba se lizează la 56°C în condiții de denaturare cu proteinază K
- Încălzirea: Incubarea la 90°C acționează împotriva legării încrucișate cu formol
- Formarea legăturii: ADN-ul se leagă de membrană, iar substanțele contaminante sunt spălate
- Spălarea: Reziduurile contaminante sunt spălate
- Eluare: ADN-ul pur, concentrat este îndepărtat de pe membrană prin eluare

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure

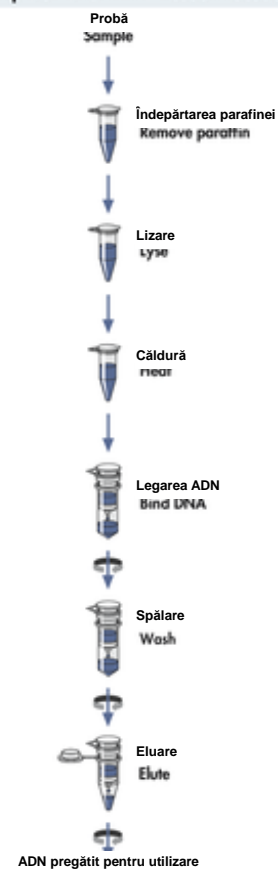


Figura 1. Procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Materiale furnizate

Conținutul kitului

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50).
Nr. de catalog			60404
Numărul de reacții			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Coloane QIAamp MinElute cu tuburi de spălare)	COL	50
WT	Wash Tubes (Tuburi de spălare) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (Tuburi de eluare) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Tuburi de liză) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Soluție tampon pentru liza țesuturilor)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (Soluție tampon pentru liză*)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (Soluție tampon pentru spălare 1* (concentrată))	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (concentrate) (Soluție tampon pentru spălare 2† (concentrată))	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer† (Soluție tampon pentru eluare†)	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (Proteinază K)	PROTK	1,25 ml
–	Instrucțiuni de utilizare (manual)	HB	1

* Conține săruri de guanidină. Nu este compatibil cu dezinfectantele care conțin substanțe de albire. Consultați pagina 10 pentru atenționări și precauții.

† Conține azidă de sodiu cu rol de conservant.

Materiale necesare care nu sunt furnizate

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, purtați întotdeauna un halat de laborator adecvat, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de siguranță (FDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Reactivi

- Xilen
- Etanol (96–100%)*

Consumabile

- Dacă se ia decizia de a nu utiliza tuburile furnizate în kit, recomandăm tuburile de microcentrifugare de 1,5 ml sau 2 ml (pentru pașii de liză) și tuburile de microcentrifugare de 1,5 ml (pentru pașii de eluare) (disponibile de la Eppendorf® [Safe-Lock: nr. cat. 022363204, US; nr. cat. 0030 120.086, Europa] sau de la Sarstedt [nr. cat. 72.690]). Recomandăm tuburile în formă conică, cu capac sigur, care nu sunt sensibile la ADN-ază sau ARN-ază.
- Pipete și vârfuri de pipete (pentru a evita contaminarea încrucișată, recomandăm în special vârfurile de pipete cu bariere pentru aerosoli)

Echipament

- Termomixer†, incubator orbital încălzit, bloc de încălzire sau baie de apă care pot oferi condițiile de incubare la 56°C, 70°C și 90°C
- Microcentrifugă† cu rotor pentru tuburi de 2 ml
- Vortex

* A nu se utiliza alcool denaturat care conține alte substanțe precum metanol sau butanonă.

† Pentru a asigura că probele sunt procesate adecvat în procedurile QIAamp DSP DNA FFPE, recomandăm în special ca instrumentele să fie calibrate respectând instrucțiunile producătorilor.

Avertizări și precauții

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, purtați întotdeauna un halat de laborator adecvat, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (FDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online în format PDF, compact și ușor de folosit, la adresa www.qiagen.com/safety, unde puteți găsi, vizualiza și tipări FDS pentru fiecare kit QIAGEN® și pentru componentele kitului.



ATENȚIE: NU adăugați soluții de albire sau soluții acide direct în deșeurile rezultate din prepararea probelor.

Soluțiile tampon AL și AW1 conțin clorhidrat de guanidină, care, în combinație cu soluțiile de albire, poate forma compuși cu reactivitate ridicată.

Dacă lichidul care conține soluția tampon se varsă, curățați cu un detergent adecvat pentru laborator și cu apă. Dacă lichidul vărsat conține agenți potențial infecțioși, curățați întâi zona afectată cu detergent pentru laborator și cu apă, iar apoi cu hipoclorit de sodiu 1% vol.

Următoarele fraze de pericol și de precauție se aplică pentru componentele kitului QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Soluție tampon AL



Conține: clorhidrat de guanidină, acid maleic. Atenție! Poate fi nociv în caz de înghițire sau inhalare. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Poate provoca o reacție alergică a pielii. Dacă iritarea ochilor persistă: Consultați medicul. **ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII:** clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. **ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA:** spălați cu multă apă și săpun. În caz de iritare a pielii: consultați medicul. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.

Soluție tampon ATL



Atenție! Provoacă iritarea ușoară a pielii. În caz de iritare a pielii: consultați medicul.

Soluție tampon AW1



Conține: clorhidrat de guanidină. Atenție! Nociv în caz de înghițire sau inhalare. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Sunați la un **CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ** sau un medic, dacă nu vă simțiți bine. Aruncați conținutul/recipientul la o unitate autorizată de eliminare a deșeurilor. Scoateți îmbrăcămintea contaminată și spălați-o înainte de reutilizare. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/echipament de protecție a ochilor/echipament de protecție a feței.

Proteinază K



Conține: Proteinază K. Pericol! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Poate provoca simptome de alergii sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceața/vaporii/spray-ul. Aruncați conținutul/recipientul la o unitate autorizată de eliminare a deșeurilor. În caz de simptome respiratorii: Sunați la un **CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ** sau un medic. **ÎN CAZ DE INHALARE:** Dacă respirația este dificilă, transportați victima la aer liber și mențineți-o în stare de repaus într-o poziție confortabilă pentru respirație. Purtați echipament de protecție respiratorie.

Depozitarea și manipularea reactivilor

Coloanele QIAamp MinElute trebuie depozitate la 2–8°C la livrare și pot fi utilizate până la data expirării indicată pe cutia kitului.

Toate soluțiile tampon pot fi depozitate la temperatura camerei (15–25°C) și pot fi utilizate până la data expirării kitului. Cu toate acestea, soluțiile tampon reconstituite AW1 și AW2 pot fi depozitate la temperatura camerei (15–25°C) pentru maximum 1 an sau până la data de expirare a kitului, oricare dintre aceste perioade este mai scurtă.

Kitul QIAamp DSP DNA FFPE Tissue conține o soluție deja pregătită de proteinază K, furnizată în soluția tampon specială de depozitare. Proteinaza K este stabilă până la data de expirare a kitului dacă este depozitată la temperatura camerei (15–25°C).

Manipularea și depozitarea probelor

Procedurile standard de fixare în formol și incorporare în parafină trebuie folosite pentru a limita extinderea fragmentării ADN-ului. Asigurați-vă că:

- Fixați probele de țesut în formol conform protocolului de laborator (este acceptat în general formol în soluție tampon neutră 10%) cât se poate de repede după recoltarea lor chirurgicală.
- Lăsați 14–24 ore pentru fixare. Limitați timpul de fixare, deoarece un timp prelungit de fixare (de exemplu, >24 ore) poate amplifica fragmentarea ADN-ului, determinând o performanță redusă în procedurile ulterioare).
- Deshidratați complet probele înainte de incorporare (formolul rezidual poate împiedica digestia proteinazei K).

ADN-ul este eluat în soluția tampon ATE și poate fi folosit imediat în reacțiile de amplificare sau pentru depozitare (condițiile variază în funcție de cerințele utilizatorului). Consultați manualele de instrucțiuni relevante ale kitului pentru condițiile de depozitare recomandate pentru procedurile ulterioare QIAGEN specifice.

Procedură

Elemente importante înainte de începere

- Toți reactivii furnizați în kitul QIAamp DSP DNA FFPE Tissue sunt destinați pentru a fi utilizați exclusiv cu ceilalți reactivi din același kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Înlocuirea reactivilor din kit duce la diminuarea performanței.
- La primirea kitului, asigurați-vă că nu există deteriorări ale componentelor. Dacă ambalajele sau recipientele cu soluții tampon sunt deteriorate, contactați Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul local. Dacă există scurgeri de lichid, consultați „Avertizări și precauții”, pagina 10). Nu utilizați componente deteriorate, întrucât acest fapt poate duce la diminuarea performanței kitului.
- Nu utilizați componente din alte kituri decât dacă aceste kituri provin din același lot.
- Evitați contaminarea microbiană a reactivilor din kit.
- Kitul trebuie folosit doar de personal calificat în practicile de laborator pentru diagnosticare in vitro.
- Utilizați întotdeauna mănuși din latex sau vinil când lucrați cu reactivii și probele pentru a preveni contaminarea de la suprafața pielii sau de la echipamentul de laborator prăfuit. Măinile și particulele de praf sunt mediul propice bacteriilor și mucegaiurilor, fiind o sursă de contaminare tipică. Schimbați frecvent mănușile și țineți tuburile închise.
- Soluțiile tampon nefolosite, efluenții (flow-throughs) și resturile probelor trebuie aruncate conform procedurilor locale.
- Dacă folosiți propriul echipament din plastic, este recomandată utilizarea tuburilor conice din polipropilenă, de 1,5-2 ml, cu capac sigur, de unică folosință, care nu permit legarea ARN-azelor și ADN-azelor.
- Toți pașii de centrifugare se efectuează la temperatura camerei (15–25°C).
- Toate soluțiile tampon trebuie depozitate la temperatura camerei (15–25°C) și trebuie amestecate bine înainte de utilizare.

- Pentru a fi folosit în pasul 11, setați termomixerul sau incubatorul orbital încălzit la 56°C. Termomixerul sau incubatorul orbital încălzit pot fi înlocuite de un bloc de încălzire sau de o baie de apă.
- Dacă soluțiile tampon AL sau ATL conțin precipitate, acestea se dizolvă încălzind la 70°C și agitând ușor.
- Asigurați-vă că soluțiile tampon AW1 și AW2 au fost pregătite urmând instrucțiunile de mai jos.
- Procedurile de control al calității de la QIAGEN includ testarea funcționalității pentru fiecare lot de kituri. Nu amestecați reactivi din loturi de kituri diferite și nu combinați reactivi individuali din loturi de reactivi diferite.

Prepararea soluțiilor tampon

Prepararea soluției tampon ATL

- Înainte de începerea procedurii, verificați dacă în soluția tampon ATL s-a format un precipitat. Dacă este necesar, dizolvați prin încălzire la 70°C, agitând ușor.

Prepararea soluției tampon AL

- Înainte de începerea procedurii, verificați dacă în soluția tampon AL s-a format un precipitat. Dacă este necesar, dizolvați prin încălzire la 70°C, agitând ușor.

Pregătirea soluției tampon AW1

- Se adaugă 25 ml etanol (96-100%) în recipientul conținând 19 ml soluție tampon AW1 concentrată. Bifați căsuța de pe eticheta recipientului pentru a indica adăugarea etanolului. Soluția tampon reconstituită AW1 poate fi depozitată la temperatura camerei (15–25°C) pentru maximum 1 an sau până la data de expirare a kitului, oricare dintre aceste perioade este mai scurtă. Recomandăm notarea datei la care soluția a fost reconstituită pe eticheta soluției tampon.

Notă: Înainte de începerea procedurii, amestecați soluția tampon reconstituită AW1 prin agitare.

Pregătirea soluției tampon AW2

- Se adaugă 30 ml etanol (96-100%) în recipientul conținând 13 ml soluție tampon AW2 concentrată. Bifați căsuța de pe eticheta recipientului pentru a indica adăugarea etanolului. Soluția tampon reconstituită AW2 poate fi depozitată la temperatura camerei (15–25°C) pentru maximum 1 an sau până la data de expirare a kitului, oricare dintre aceste perioade este mai scurtă. Recomandăm notarea datei la care soluția a fost reconstituită pe eticheta soluției tampon.

Notă: Înainte de începerea procedurii, amestecați soluția tampon AW2 reconstituită prin agitare.

Materialul de început

Materialul de început în purificarea ADN-ului constă în secțiuni preparate de țesut FFPE (ideal proaspăt preparate). Secțiuni multiple pot fi combinate într-o preparare. Dacă nu aveți informații despre natura materialului de început, recomandăm să începeți cu cel mult trei secțiuni într-o preparare.

Utilizatorul trebuie să optimizeze numărul de secțiuni, grosimea și suprafața acestora pentru fiecare procedură din laborator. În cazul în care kitul este folosit complementar cu o procedură ulterioară QIAGEN, consultați manualul de instrucțiuni aferent.

Procedura de manipulare pentru evitarea contaminării încrucișate

Datorită sensibilității tehnologiilor de amplificare a acizilor nucleici, următoarele precauții sunt necesare în timpul manipulării coloanelor QIAamp MinElute pentru a evita contaminarea încrucișată a probelor:

- Nu umpleți până la refuz tuburile cu țesut.
- Schimbați bisturiul între probe când manipulați țesutul.
- Introduceți cu atenție proba sau soluția în coloana QIAamp MinElute. Pipetați proba în coloana QIAamp MinElute fără a umezi gura coloanei.
- Schimbați întotdeauna vârful pipetelor între transferurile de lichide. Recomandăm utilizarea vârfulor de pipete cu bariere pentru aerosoli.
- Utilizați întotdeauna tuburi de spălare noi când efectuați pași de spălare a probei.
- Asigurați-vă că tuburile sunt perfect închise înainte de procedurile care implică vortexul și centrifuga.
- Asigurați-vă că înainte de centrifugare coloana QIAamp MinElute este perfect închisă.
- După agitarea pulsată cu ajutorul vortexului și pașii de incubare la 90°C, centrifugați scurt tuburile de microcentrifugare pentru a îndepărta picăturile de pe interiorul capacelor.
- Deschideți o singură coloană QIAamp MinElute o dată și asigurați-vă că evitați formarea de aerosoli.
- Schimbați întotdeauna bisturiul între probe.
- Schimbați întotdeauna vârful pipetelor între transferurile de lichide. Pentru a reduce la minimum contaminarea încrucișată, recomandăm utilizarea vârfulor de pipete cu bariere pentru aerosoli și evitarea utilizării pipetelor pentru mai mulți pași.
- Utilizați întotdeauna mănuși de unică folosință și verificați periodic dacă au fost contaminate cu probă. Aruncați mănușile dacă aveți suspiciunea că sunt contaminate.
- Deschideți un singur tub o dată.

Centrifugare

Coloanele QIAamp MinElute încap în majoritatea tuburilor de microcentrifugare de 1,5–2 ml. Tuburi de spălare de 2 ml sunt de asemenea disponibile separat. (QIAGEN, nr. cat. 19201). Centrifugarea coloanelor QIAamp MinElute este efectuată la aproximativ 6000 x g pentru a reduce zgomotul centrifugei. Centrifugarea la viteză maximă nu va îmbunătăți randamentele ADN-ului. Cu toate acestea, centrifugarea coloanelor QIAamp MinElute la viteză maximă este necesară în doi pași ai procedurii: atât în pasul de centrifugare uscată după ce membranele sunt spălate, cât și în pasul de eluare. Centrifugarea la viteză maximă este de asemenea necesară pentru a sedimenta proba după tratamentul cu xilen și după pasul de spălare cu etanol.

Toți pașii de centrifugare trebuie efectuați la temperatura camerei (15–25°C). Temperatura scăzută de centrifugare poate duce la o extracție suboptimă.

Procesarea coloanelor QIAamp MinElute în microcentrifugă

- Închideți întotdeauna coloanele QIAamp MinElute înainte de a le introduce în microcentrifugă.
- Evitați să atingeți membrana coloanei QIAamp MinElute cu vârful pipetei.
- Frajeciile de efluenți (flow-through) pot conține deșeuri periculoase și trebuie eliminate corespunzător.
- Pentru procesarea eficientă în paralel a mai multor probe, recomandăm pregătirea unui suport cu tuburi de spălare goale, în care ulterior coloanele QIAamp MinElute pot fi transferate după centrifugare. Tuburile de spălare folosite conținând efluent (flow-through) pot fi aruncate și noile tuburi de spălare conținând coloanele QIAamp MinElute pot fi introduse direct în microcentrifugă.
- Asigurați-vă că puteți urmări probele în decursul întregului proces.

Eluarea ADN-ului purificat

Pentru proceduri ulterioare care necesită volume de început reduse (precum unele evaluări PCR), un eluat mai concentrat poate crește sensibilitatea evaluării, dar poate determina și o creștere în concentrație a potențialilor inhibitori.

O creștere în volumul de eluat va reduce concentrația de ADN din eluat.

Volumul de eluat recuperat poate fi cu aproximativ 5 μ l mai redus decât volumul de soluție tampon ATE aplicată în coloana QIAamp MinElute. De exemplu, un volum de eluare de 20 μ l rezultă în ≥ 15 μ l eluat. Volumul de eluat recuperat depinde de natura probei.

Este responsabilitatea utilizatorului să optimizeze volumul de eluare pentru fiecare procedură utilizată în laborator. Consultați manualele de instrucțiuni ale kitului pentru volumele de eluare recomandate pentru procedurile ulterioare QIAGEN specifice.

Randamentele pot fi crescute dacă înainte de centrifugare, pentru 5 minute, coloana se incubează cu soluție tampon ATE la temperatura camerei. ADN-ul eluat poate fi colectat în tuburi de 1,5 ml (furnizate). Condițiile de depozitare pentru ADN-ul eluat depind de condițiile stabilite de utilizator. Consultați manualele de instrucțiuni ale kitului pentru condițiile de depozitare recomandate pentru procedurile ulterioare QIAGEN specifice.

Protocol: Izolarea ADN-ului genomic din secțiunile de țesut FFPE

Procedură

1. Folosind un bisturiu, îndepărtați excesul de parafină de pe blocul de probă.
2. Tăiați secțiunile respectând standardele practicilor de laborator (consultați „Materialul de început”, pagina 15). Utilizatorul trebuie să optimizeze numărul de secțiuni, grosimea și suprafața acestora pentru fiecare procedură din laborator. Asigurați-vă că probele pot fi urmărite pe parcursul întregii proceduri.
3. Detașați imediat țesutul de secțiuni utilizând un bisturiu steril introducându-l într-un tub de liză (furnizat). Asigurați-vă că toate țesuturile disponibile sunt introduse în tub. Adăugați 1 ml xilen în probă, închideți capacul și agitați puternic cu vortexul până când parafina se dizolvă (de exemplu, 10 s). Asigurați-vă că tubul este perfect închis pentru a evita scurgerea xilenului, contaminarea încrucișată a probelor și posibilul contact cu xilenul.
Notă: Utilizați xilen în nișă sau în alt aparat adecvat.
4. Centrifugați la viteză maximă pentru aproximativ 2 minute la temperatura camerei pentru a colecta peletul de țesut. Dacă nu se formează pelet de țesut, repetați pasul.
Notă: Temperatura scăzută de centrifugare poate duce la o extracție suboptimă.
5. Îndepărtați lichidul supernatant pipetându-l și eliminându-l. Păstrați peletul.
Lichidul supernatant conține xilen, un deșeu periculos care trebuie eliminat conform cu reglementările locale.
6. Adăugați 1 ml etanol (96-100%) la peletul de țesut și amestecați cu ajutorul vortexului. Etanolul extrage xilenul rezidual din probă și trebuie eliminat corespunzător.

7. Centrifugați la viteză maximă pentru aproximativ 2 minute la temperatura camerei.

Eliminați lichidul supernatant prin pipetare. Nu îndepărtați peletul.

Îndepărtați cu grijă etanolul rezidual folosind un vârf fin de pipetă. Deschideți tubul și incubați-l la 15–40°C până când etanolul rezidual este evaporat. Îndepărtarea etanolului rezidual este crucială pentru succesul extracției.

Notă: O temperatură de incubare mai scăzută încetinește timpul de evaporare, în timp ce o temperatură mai ridicată poate usca peletul prea mult, făcând dificilă obținerea suspensiei.

8. Resuspendați peletul în 180 µl soluție tampon ATL. Adăugați 20 µl Proteinază K și amestecați cu ajutorul vortexului.

Notă: Peletul trebuie să fie bine resuspendat în soluția tampon ATL pentru a asigura reconstituirea sa cu randament maxim.

9. Incubați la 56°C ± 3°C pentru aproximativ 1 oră (până când proba este perfect lizată).

10. Incubați la 90°C ± 5°C pentru 1 oră ± 5 minute.

Incubarea la 90°C în soluție tampon ATL inversează parțial modificarea indusă de formaldehidă asupra acizilor nucleici. Timpii de incubare mai reduși sau temperaturile de incubare mai scăzute pot influența calitatea și cantitatea ADN-ului. Dacă folosiți un singur bloc de încălzire, lăsați proba la temperatura camerei după incubarea la 56°C până când blocul atinge temperatura de 90°C.

11. Centrifugați scurt tubul pentru a îndepărta picăturile de pe interiorul capacului.

12. Adăugați 200 µl soluție tampon AL în probă și amestecați cu ajutorul vortexului. Apoi adăugați 200 µl etanol (96-100%) și amestecați cu ajutorul vortexului.

Este esențial ca proba, soluția tampon AL și etanolul să fie amestecate imediat și complet cu ajutorul vortexului sau pipetând până la obținerea unei soluții omogene. Soluția tampon AL și etanolul pot fi amestecate înainte și adăugate deodată într-un singur pas pentru a scuti timp când sunt procesate mai multe probe. Un precipitat alb se poate forma la adăugarea soluției tampon AL și a etanolului. Acest precipitat nu interferează cu procedura QIAamp. Utilizați întotdeauna amestecuri proaspete și aruncați-le imediat după folosire.

13. Centrifugați scurt tubul pentru a îndepărta picăturile de pe interiorul capacului.
14. Transferați cu atenție întregul lizat în coloana QIAamp MinElute (într-un tub de spălare de 2 ml) fără a umezi gura coloanei, închideți capacul și centrifugați la aproximativ 6000 x g pentru ≥1 minut. Puneți coloana QIAamp MinElute într-un tub de spălare de 2 ml curat (furnizat) și aruncați tubul de spălare conținând efluent (flow-through).
Dacă lizatul nu a trecut în totalitate prin membrană după centrifugare, centrifugați încă o dată la o viteză mai mare până când coloana QIAamp MinElute este goală.
15. Deschideți cu grijă coloana QIAamp MinElute și adăugați 500 μl soluție tampon AW1 reconstituită fără a umezi gura coloanei. Închideți capacul și centrifugați la aproximativ 6000 x g pentru ≥1 minut. Puneți coloana QIAamp MinElute într-un tub de spălare de 2 ml și aruncați tubul de spălare conținând efluent (flow-through).
16. Deschideți cu grijă coloana QIAamp MinElute și adăugați 500 μl soluție tampon AW2 reconstituită fără a umezi gura coloanei. Închideți capacul și centrifugați la aproximativ 6000 x g pentru ≥1 minut. Puneți coloana QIAamp MinElute într-un tub de spălare de 2 ml și aruncați tubul de spălare conținând efluent (flow-through).
Contactul între coloana QIAamp MinElute și efluent (flow-through) trebuie evitat. Asigurați-vă că echilibrați rotorul centrifugei. Unele rotoare de centrifugă vibrează la decelerare, fapt ce poate face ca efluentul (flow-through) care conține etanol să intre în contact cu coloana QIAamp MinElute. La îndepărtarea coloanei QIAamp MinElute și a tubului de spălare din rotor, aveți grijă ca efluentul (flow-through) să nu intre în contact cu coloana QIAamp MinElute.
17. Centrifugați la viteză maximă (aproximativ 20.000 x g) pentru aproximativ 3 minute pentru a usca membrana.
Etanolul rămas în eluat poate interfera cu unele dintre procedurile ulterioare.

18. Puneți coloana QIAamp MinElute într-un tub de eluare de 1,5 ml (furnizat) și aruncați tubul de spălare conținând efluentul (flow-through). Deschideți cu atenție capacul coloanei QIAamp MinElute și aplicați 20–200 μ l soluție tampon ATE la centrul membranei.

IMPORTANT: Dacă utilizați volume de eluare mici (<50 μ l), adăugați soluția tampon ATE direct în centrul membranei pentru a asigura eluarea completă a ADN-ului legat. Coloanele QIAamp MinElute permit alegerea flexibilă a volumului de eluare. Alegeți volumul conform cerințelor procedurilor ulterioare. Volumul de eluat va fi cu aproximativ 5 μ l mai redus decât volumul de soluție de eluare introdus inițial în coloană.

19. Închideți capacul și incubați la temperatura camerei (15–25°C) pentru cel puțin 1 minut. Centrifugați la viteză maximă (aproximativ 20.000 x g) pentru \geq 1 minut.

Incubarea coloanei QIAamp MinElute încărcate cu soluție tampon ATE pentru aproximativ 5 minute la temperatura camerei, înainte de centrifugare, poate crește randamentul ADN-ului.

Controlul calității

În conformitate cu sistemul de management al calității certificat ISO al QIAGEN, fiecare lot de kituri QIAamp DSP DNA FFPE Tissue este testat în privința specificațiilor prestabilite, pentru a asigura calitatea consecventă a produsului.

Limitări

Performanța kitului a fost stabilită utilizând țesuturi fixate în formol, incorporate în parafină (FFPE) pentru izolarea ADN-ului genomic.

Validarea performanței sistemului pentru orice proceduri utilizate în laborator care nu fac obiectul studiilor de evaluare a performanței QIAGEN descrise în manual constituie răspunderea utilizatorului.

Pentru a reduce la minimum riscul de impact negativ asupra rezultatelor de diagnostic, trebuie utilizate controale adecvate pentru procedurile ulterioare. Pentru validarea ulterioară, consultați recomandările Conferinței Internaționale pentru Armonizarea Reglementărilor Tehnice (International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH) din ICH Q2 (R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Validarea procedurilor analitice: text și metodologie ICH Q2 (R1)).

Orice rezultate de diagnostic care sunt generate trebuie interpretate în coroborare cu alte rezultate clinice sau de laborator.











La utilizarea kitului QIAamp DSP DNA FFPE Tissue, ARN-ul poate fi copurificat cu ADN-ul dacă este prezent în probă.












Caracteristici de performanță

Vizitați www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE pentru caracteristicile de performanță ale kitului QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Simboluri

Simbolurile următoare pot apărea pe ambalaj și etichete:

Simbol	Definiția simbolului
	Conține reactiv suficient pentru <N> reacții
	Data de expirare
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	La livrare
	Număr catalog
	Număr de lot
	Numărul materialului
	Componente
	Conține
	Număr

Simbol	Definiția simbolului
	Conține reactiv suficient pentru <N> reacții
	Scrieți data curentă la adăugarea etanolului în recipient
	Etanol
	Adăugare
	Clorhidrat de guanidină
	Acid maleic
	Număr de comercializare global articol
	Limitări de temperatură
	Producător
	Consultați instrucțiunile de utilizare
	Atenție

Date de contact

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru Asistență Tehnică la adresa **www.qiagen.com/Support**, sunați la 00800-22-44-6000 sau adresați-vă Departamentelor de Servicii Tehnice ale QIAGEN sau distribuitorilor locali (consultați coperta a patra sau vizitați **www.qiagen.com**).

Informații pentru comandă

Produs	Conținut	Nr. cat.
Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue — pentru purificarea ADN-ului genomic din țesuturile incorporate în parafină		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pentru 50 de preparate ADN: 50 coloane QIAamp MinElute®, Proteinaza K, Soluții tampon, Tuburi de spălare (2 ml), Tuburi de eluare (1,5 ml), Tuburi de liză (2 ml)	60404

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați manualul kitului QIAGEN respectiv sau manualul de utilizare. Manualele kiturilor QIAGEN și manualele de utilizare sunt disponibile la adresa www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciile Tehnice QIAGEN sau distribuitorul dvs. local.

Mărci comerciale: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Acord de licență limitat pentru Manualul de instrucțiuni al kitului QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în trusă. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în această trusă cu orice componentă care nu este inclusă în această trusă, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa www.qiagen.com. Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
2. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că această trusă și/sau utilizarea (utilizările) acesteia nu încalcă drepturile terților.
3. Această trusă și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
4. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
5. Cumpărătorul și utilizatorul trusei acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre acțiunile interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de trusă și/sau componentele acesteia.

Pentru termenii actualizați ai licenței, consultați www.qiagen.com.

Feb-17 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

Pentru comenzi www.qiagen.com/contact | Suport tehnic support.qiagen.com | Site web www.qiagen.com