

Bruksanvisning för QIASymphony[®] DSP DNA Mini Kit (protokollblad)

Tissue_LC_200_V7_DSP- och Tissue_HC_200_V7_DSP-protokoll

Version 2

IVD

För in vitro-diagnostisk användning

För användning med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)

CE

REF

937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Protokollbladet finns tillgängligt elektroniskt och finns under resursfliken på produktsidan på www.qiagen.com.

Allmän information

QIASymphony DSP DNA Kit är avsett för in vitro-diagnostisk.

Dessa protokoll är avsedda för rening av totalt DNA från vävnader och formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) vävnader med användning av QIASymphony SP och QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Beroende på provtypen rekommenderar vi användningen av antingen protokollet för lågt innehåll (Low Content, LC) eller protokollet för högt innehåll (High Content, HC). Vävnader ger mer DNA när de bearbetas med protokollet för högt innehåll, men protokollet för lågt innehåll kan användas i kombination med en liten elueringsvolym (50 µl) om det krävs en hög DNA-koncentration. För FFPE-vävnad rekommenderar vi att protokollet för lågt innehåll används.

Protokoll för lågt innehåll

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236)
Provmaterial	FFPE-vävnad och vävnad* Upp till 4 FFPE-vävnadssnitt, vart och ett med en tjocklek på upp till 10 µm, eller 8 snitt med en tjocklek på upp till 5 µm och en ytarea på upp till 250 mm ² , kan kombineras i ett preparat.
Protokollnamn	Tissue_LC_200_V7_DSP
Förvald analyskontrolluppsättning	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elueringsvolym	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
Nödvändig programversion	Version 4.0 eller senare
Obligatorisk programvarukonfiguration för IVD-användning	Standardprofil 1

* Se protokollet för högt innehåll för information om vävnadsprover.

Protokollet för högt innehåll

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.nr 937236)
Provmaterial	Vävnad Om det saknas information om den förväntade mängden rekommenderar vi att du börjar med 25 mg provmaterial. Beroende på mängden som erhålls kan provstorleken ökas i påföljande preparat.
Protokollnamn	Tissue_HC_200_V7_DSP
Förvald analyskontrolluppsättning	ACS_TissueHLC_200_V7_DSP
Elueringsvolym	50, 100, 200 eller 400 µl
Nödvändig programversion	Version 4.0 eller senare
Obligatorisk programvarukonfiguration för IVD-användning	Standardprofil 1

Material som behövs men inte medföljer

För alla provtyper

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (kat.nr 939016)
- För att minimera RNA-innehåll: DNase-fritt RNase A (stamlösning på 100 mg/ml)

För FFPE-vävnad (xylenfri deparaffinering)

- Deparaffinization Solution (kat.nr 939018)

För FFPE-vävnad (deparaffinering med xylol)

- Xylol (99-100 %)
- Etanol (96-100 %) *

Lådan "Sample" (prov)

Provtyp	FFPE-vävnad och vävnad
Provolym	220 µl (krävs per prov enligt protokollet)*
Bearbetad provvolym	200 µl
Primära provrör	Ej relevant
Sekundära provrör	Mer information finns i labbmateriellista, som finns i resursfliken på produktsidan på www.qiagen.com .
Insatser	Mer information finns i labbmateriellista, som finns i resursfliken på produktsidan på www.qiagen.com .

* För både protokoll för högt och lågt innehåll kommer systemet inte upptäcka det om provvolymen är mindre än 220 µl eftersom provöverföringen utförs utan vätskenivådetektion. Säkerställ därför att provinmatningsvolymen är 220 µl.

n/a = ej relevant.

Lådan "Reagents and Consumables" (reagens och förbrukningsmaterial)

Position A1 och/eller A2	Reagenskasset (RC)
Position B1	Ej relevant
Spetsrackhållare 1-17	Engångsfilterspetsar, 200 µl eller 1500 µl
Hållare för enhetslådor 1-4	Enhetslådor som innehåller provprepareringskassetter eller 8-Rod Covers

n/a = ej relevant.

* Använd inte denaturerad alkohol, som innehåller andra substanser, exempelvis metanol eller metyletylketon.

Lådan "Waste" (avfall)

Hållare för enhetslådor 1-4	Tomma enhetslådor
Avfallspåhållare	Avfallspåse
Hållare för flaska för flytande avfall	Tom flaska för flytande avfall

Lådan "Eluate" (eluat)

Elueringsställ (vi rekommenderar att uttag 1, kylpositionen, används)

Mer information finns i labbmateriellistan, som finns i resursfliken på produktsidan på www.qiagen.com.

Erforderliga plastartiklar

Plastartiklar	En batch 24 prover*	Två batcher 48 prover*	Tre batcher 72 prover*	Fyra batcher 96 prover*
Disposable filter-tips, 200 µl†	26	50	74	98
Disposable filter-tips, 1500 µl†	72	136	200	264
Sample prep cartridges§	21	42	63	84
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* Om färre än 24 prover per batch används minskas antalet engångsfilterspetsar som krävs per körning.

† Det finns 32 filterspetsar/spetsställ.

‡ Antalet filterspetsar som krävs inbegriper filterspetsar för 1 inventarieskanning per RC.

§ Det finns 28 provberedningskassetter/enhetslåda.

¶ Det finns tolv 8-Rod Covers/enhetslåda.

OBS! Beroende på inställningarna kan antalet givna filterspetsar skilja sig från de siffror som visas på pekskärmen. Vi rekommenderar att det maximala antalet spetsar laddas.

Elueringsvolym

Elueringsvolymen väljs på pekskärmen. Beroende på provtyp och DNA-innehåll kan den slutliga volymen variera med upp till 15 µl mindre än den valda volymen. Eftersom elueringsvolymen kan variera rekommenderar vi att du kontrollerar den faktiska elueringsvolymen vid användning av ett automatiserat analysinställningssystem som inte verifierar elueringsvolymen innan överföringen. Eluering i lägre volymer ökar den slutliga DNA-koncentrationen, men reducerar mängden något. Vi rekommenderar att du använder en elueringsvolym som är lämplig för den avsedda nedströmstillämpningen.

Förberedelse av provmaterial

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (Safety Data Sheets, SDS) som kan erhållas av respektive tillverkare.

För allmänna rekommendationer om insamling, transport och förvaring se godkänd CLSI -riktlinje MM13-A "Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods".

Saker som måste göras före start

- Kontrollera Buffer ATL avseende vitt precipitat. Inkubera vid behov i 30 minuter vid 37 °C med skakning då och då för att lösa upp precipitat.
- Ställ in en termomixer eller skakapparat-inkubator på den temperatur som krävs för respektive förbehandling.

Vävnader

Färska och frysta vävnader kan användas för DNA-rening. Den erhållna DNA-mängden och -kvaliteten beror på vävnadstyp, vävnadskälla och förvaringsförhållanden. Färsk vävnad kan skäras i små bitar och förvaras vid -20 °C eller -80 °C före bearbetning. I allmänhet rekommenderar vi att du använder protokollet för högt innehåll, vilket ger ökad DNA-mängd. Protokollet för lågt innehåll, i kombination med elueringsvolymen 50 µl, rekommenderas endast om det behövs höga DNA-koncentrationer för nedströmsanalys. Om det saknas information om den förväntade mängden rekommenderar vi att du börjar med 25 mg provmaterial med användning av protokollet för högt innehåll och elueringsvolymen på 200 µl. Beroende på mängden som erhålls kan provstorleken ökas eller elueringsvolymen kan minskas i påföljande preparat. Tänk på att en överbelastning av preparat i kombination med små elueringsvolymmer kan göra att det sker en överföring (carryover) av magnetiska partiklar till eluatet vilket kan försämra DNA-renhet och nedströmsanalys.

OBS! Vid arbete med frysta vävnadsprov bör ISO 20184-3:2021 (E) för automatiserad NA-extrahering från frysta vävnadsprov observeras.

OBS! Provstabilitet beror på olika faktorer och relaterar till den specifika nerströmsapplikationen. Det är användarens ansvar att konsultera bruksanvisningen för specifika nerströmsapplikationer som används i deras laboratorier och/eller validera hela arbetsflödet för att etablera tillämpliga för.

Förbehandlingsprotokoll för vävnad

1. Överför vävnadsprovet till ett 2 ml mikrocentrifugrör (ingår inte).
2. Tillsätt 220 µl Buffer ATL.
3. Tillsätt 20 µl proteinas K och blanda genom att knacka lätt på provröret.
OBS! Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
4. Placera provröret i en termomixer eller skakapparat-inkubator och inkubera vid 56 °C med skakning vid 900 rpm tills vävnaden är helt lyserad.
OBS! Lyseringstiden varierar beroende på vävnaden som bearbetas. För de flesta vävnader avslutas lysering inom 3 timmar. Om lysering är ofullständig efter 3 timmar, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material eller kraftigt viskösa lysat, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material kan avlägsnas med centrifugering så som beskrivs i steg 6. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.
5. För att minimera RNA-innehållet i provet tillsätter du 4 µl RNase A (100 mg/ml) till den undre fasen och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur (15-25 °C) innan du fortsätter med steg 6.
6. Homogenisera provet genom att pipettera upp och ned flera gånger.
OBS! Om det fortfarande finns olösligt material kvar centrifugerar du vid 3 000 x g i 1 min.
7. Överför försiktigt 220 µl supernatant till provrör som är kompatibla med probäraren för QIASymphony SP.
8. Det finns en fullständig lista över kompatibla provrör på www.qiagen.com. Vi rekommenderar användning av 2 ml provrör (t.ex. Sarstedt, kat.nr 72.693 eller 72.608).

FFPE-vävnad

Stannar FFPE-procedurer leder alltid till betydande fragmentering av nukleinsyror. Begränsa omfattningen av DNA-fragmentering genom att:

- fixera vävnadsprover i 4-10 % formalin snarast möjligt efter kirurgisk provtagning
- använd en fixeringstid på 14-24 timmar (längre fixeringstider leder till allvarligare DNA-fragmentering, vilket ger dålig prestanda vid nedströmsanalyser)
- dehydrera prover noggrant före inbäddning (formalinrester kan hämma proteinas K-digereringen).

Startmaterial för DNA-rening ska vara färska snitt av FFPE-vävnad. Upp till 4 snitt, vart och ett med en tjocklek på upp till 10 µm, eller 8 snitt med en tjocklek på upp till 5 µm och en ytarea på upp till 250 mm², kan bearbetas i ett preparat. Om det inte finns information om startmaterialens egenskaper rekommenderar vi att börja med högst 3 snitt i ett preparat. Beroende på DNA-mängd och -renhet, kan det vara möjligt att använda upp till 8 snitt i påföljande preparat.

OBS! Vid arbete med FFPE-vävnad bör ISO 20166-3:2018 (E) för automatiserad Na-extrahering från FFPE-vävnad observeras för ytterligare information om provhantering.

OBS! FFPE-vävnadsprotokollen är specialutformade för att endast rena små mängder RNA samtidigt. Detta leder till ett lägre fometrimätvärde jämfört med värden som erhålls med den manuella QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Förbehandlingsprotokoll för FFPE-vävnad

Metod 1: deparaffinering med Deparaffinization Solution

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell.
2. Skär av upp till 4 snitt som är 10 µm tjocka eller upp till 8 snitt som är 5 µm tjocka.
OBS! Om provytan har exponerats för luft ska de första 2-3 snitten kasseras.
3. Placera omedelbart snitten i ett 2 ml Sarstedt-rör (ingår inte, kat.nr 72.693 eller 72.608) som är kompatibelt med provbäraren för QIASymphony SP.
4. Tillsätt 200 µl Buffer ATL till snitten.
5. Tillsätt 20 µl proteinas K.
OBS! Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Tillsätt 160 µl eller 320 µl Deparaffinization Solution (se följande tabell) och vortexblanda.

Snittjocklek	Antal snitt	Volym Deparaffinization Solution
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Placera provröret i en ThermoMixer eller skakapparat-inkubator och inkubera vid 56 °C i 1 timme med skakning vid 1 000 rpm tills vävnaden är helt lyserad.

OBS! Lyseringstiden varierar beroende på vävnaden som bearbetas. För de flesta vävnader slutförs lysering inom 1 timme. Om lysering är ofullständig efter 1 timme, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material kan pelleras med centrifugering som beskrivet i steg 10. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.

8. Inkubera vid 90 °C i 1 timme.

OBS! Inkuberingen vid 90 °C i Buffer ATL häver delvis formaldehydmodifieringen av nukleinsyror. Längre inkuberingstider eller högre inkuberingstemperaturer kan leda till ett mer fragmenterat DNA. Om endast ett värmeblock används ska provet stå i rumstemperatur efter inkuberingen vid 56 °C tills värmeblocket är uppe i 90 °C.

9. För att minimera RNA-innehållet i provet tillsätter du 2 µl RNase A (100 mg/ml) till den undre fasen och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur innan du fortsätter med steg 10. Låt provet svalna till rumstemperatur innan RNase A tillsätts.

10. Centrifugera vid full hastighet i 1 minut vid rumstemperatur.

11. Överför försiktigt provrör (innehållande båda faserna) till provbäraren för QIASymphony SP.

Metod 2: deparaffinisering med xylol

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell.

2. Skär av upp till 4 snitt som är 10 µm tjocka eller upp till 8 snitt som är 5 µm tjocka.

OBS! Om provytan har exponerats för luft ska de första 2-3 snitten kasseras.

3. Placera omedelbart snitten i ett 1,5 eller 2 ml mikrocentrifugrör (ingår inte) och tillsätt 1 ml xylol till provet. Stäng locket och vortexblanda kraftigt i 10 s.

4. Centrifugera vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur.

5. Avlägsna supernatanten genom pipettering. Avlägsna inte något av pelleten.

6. Tillsätt 1 ml etanol (96-100 %) till pelleten och vortexblanda.

OBS! Etanolet extraherar xylolrester från provet.

7. Centrifugera vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur.

8. Avlägsna supernatanten genom pipettering. Avlägsna inte något av pelleten.

OBS! Avlägsna försiktigt etanolrester med en pipett med fin spets.

9. Öppna provröret och inkubera vid rumstemperatur (15-25 °C) i 10 minuter eller tills alla etanolrester har avdunstat.

OBS! Inkubering kan ske vid temperaturer upp till 37 °C.

10. Återsuspendera pelleten i 220 µl Buffer ATL.

11. Tillsätt 20 µl proteinas K och vortexblanda.

OBS! Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

12. Inkubera vid 56 °C i 1 timme (eller tills provet är fullständigt lyserat).

OBS! Lyseringstiden varierar beroende på vävnaden som bearbetas. För de flesta vävnader avslutas lysering inom 1 timme. Om lysering är ofullständig efter 1 timme, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material kan avlägsnas med centrifugering som beskrivet i steg 16. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.

13. Inkubera vid 90 °C i 1 timme.

OBS! Inkuberingen vid 90 °C i Buffer ATL häver delvis formaldehydmodifieringen av nukleinsyror. Längre inkuberingstider eller högre inkuberingstemperaturer kan leda till ett mer fragmenterat DNA. Om endast ett värmeblock används ska provet stå i rumstemperatur efter inkuberingen vid 56 °C tills värmeblocket är uppe i 90 °C.

14. Centrifugera provet som hastigast för att avlägsna droppar från lockets insida.
15. För att minimera RNA-innehållet i provet tillsätter du 2 µl RNase A (100 mg/ml) och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur innan du fortsätter med steg 16. Låt provet svalna till rumstemperatur innan RNase A tillsätts.
16. Överför försiktigt 220 µl av lysatet till provrör som är kompatibla med probäraren för QIASymphony SP.
OBS! Om lysat innehåller ej digererat material centrifugerar du vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur innan supernatanten överförs till provrör. Det finns en fullständig lista över kompatibla provrör på www.qiagen.com. Vi rekommenderar användning av 2 ml provrör (t.ex. Sarstedt, kat.nr 72.693 eller 72.608).

Förvaring av eluat

Vi rekommenderar att du tar ut eluatplattan från lådan "Eluate" (eluat) omedelbart efter att körningen är slutförd. Elueringsplattor kan lämnas kvar i QIASymphony SP när körningen slutförs på natten (maximalt 12 timmar inklusive körningstiden; rekommenderade miljöförhållanden: 18-26 °C och 20-75 % relativ luftfuktighet). Beroende på temperatur och luftfuktighet kan eluat kondensera eller avdunsta.

För korttidsförvaring kan eluat kan förvaras i rumstemperatur i upp till 2 veckor. För långtidsförvaring rekommenderar vi förvaring i 2-8°C, -20°C eller -80°C.

OBS! Eluatstabilitet beror på olika faktorer och relaterar till den specifika nedströmsappliceringen. Det har etablerats för QIASymphony DSP DNA Mini Kit tillsammans med nerströmsapplikationer som exempel. Det är användarens ansvar att konsultera bruksanvisningen för specifika nerströmsapplikationer som används i deras laboratorier och/eller validera hela arbetsflödet för att etablera tillämpliga för.

Viktigt moment före start

- QIASymphony magnetiska partiklar renar både RNA och DNA samtidigt om båda finns i provet. Om RNA-fritt DNA krävs, tillsätter du RNase A till provet i det steg som anges i respektive förbehandlingsprotokoll.





Begränsningar och interfererande ämnen

Under utvecklingen av QIASymphony DSP DNA Mini Kit identifierades inga interfererande ämnen som hade en negativ effekt på provberedningen.

OBS! Tester utfördes med nerströmsapplikationer som exempel för en bedömning av kvaliteten av extraherade nukleinsyror. Dock kan olika nerströmsapplikationer ha olika krav avseende renhet (dvs. frånvaro av potentiellt interfererande ämnen), så att identifieringen och testningen av relevanta ämnen också måste etableras som en del av utvecklingen av nerströmsapplikationen för alla arbetsflöden som involverar QIASymphony DSP DNA Mini Kits.

Symboler

Följande symboler förekommer i detta dokument. För en komplett lista med symboler som används i bruksanvisningen eller på förpackningen eller etiketterna, se handboken.

Symbol	Symbolförklaring
	Den här produkten uppfyller kraven i Europeisk Regel 2017/746 för in vitro-diagnostiska medicintekniska enheter.
	In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet
	Katalognummer
Rn	R betyder revidering av bruksanvisningen och n är revisionsnumret
	Tillverkare

Revisionshistorik

Revision	Beskrivning
R1, juni 2022	Version 2, revision 1 <ul style="list-style-type: none">• Uppdatera till version 2 för efterlevnad med IVD• Tillägg av avsnitt Begränsningar och interfererande ämnen• Tillägg av avsnitt Förvaring av eluat• Tillägg av avsnitt Symboler• Uppdatering av avsnitt Förberedelse av provmaterial

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller bruksanvisningen till respektive QIAGEN®-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-satsen finns tillgängliga på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN tekniska service eller din lokala återförsäljare.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); BD™ (Becton Dickinson and Company); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Registrerade namn, varumärken med mera som används i detta dokument ska inte anses som oskyddade enligt lag, även om de inte uttryckligen anges som skyddade.
06/2022 HB-3029-S07-001 © 2022 QIAGEN, med ensamrätt.