

Bruksanvisning till RNeasy[®] DSP FFPE Kit (handbok)



Version 2

IVD

För in vitro-diagnostisk användning

För användning med RNeasy DSP FFPE Kit

CE

REF

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1 MAT

1127532SV

Innehåll

| | |
|---|----|
| Avsedd användning | 4 |
| Avsedd användare | 4 |
| Beskrivning och princip | 5 |
| Sammanfattning och förklaring..... | 5 |
| Testprinciper | 6 |
| Material som medföljer..... | 8 |
| Kitinnehåll | 8 |
| Paketets innehåll..... | 9 |
| Material som behövs men inte medföljer..... | 10 |
| Varningar och försiktighetsåtgärder | 11 |
| Säkerhetsinformation..... | 11 |
| Vid nödsituationer | 12 |
| Försiktighetsåtgärder..... | 12 |
| Förvaring och hantering av reagenser..... | 14 |
| Användningsstabilitet | 14 |
| Kitkomponenter | 14 |
| Förfarande..... | 15 |
| Viktigt att tänka på före start..... | 15 |
| Bereda buffertar | 16 |
| Saker som måste göras före start..... | 17 |
| Protokoll: Rening av total RNA från FFPE-vävnadssnitt | 18 |
| Kvalitetskontroll | 22 |

| | |
|--|----|
| Begränsningar..... | 22 |
| Prestandaegenskaper | 23 |
| Bortskaffning | 24 |
| Felsökningshandbok..... | 25 |
| Symboler | 28 |
| Kontaktinformation | 30 |
| Bilaga: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering | 31 |
| Beställningsinformation | 33 |
| Dokumentrevisioner..... | 34 |

Avsedd användning

RNeasy DSP FFPE Kit är ett system avsett för manuell rening av total RNA från formalinfixerad paraffinbäddad (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) vävnad.

Det startar ett optimerat silikonkolonnbaserat protokoll och inkluderar enzymatiskt avlägsnande av kvarvarande DNA.

RNeasy DSP FFPE Kit är avsett för in vitro-diagnostisk

Avsedd användare

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, t.ex. laboratorietechniker och läkare som är utbildade i molekylärbiologiska tekniker.

Beskrivning och princip

Sammanfattning och förklaring

RNeasy DSP FFPE Kit är speciellt utformat för rening av total RNA från formalinfixerad paraffinbäddade (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded, FFPE) vävnadssnitt. Genom att isolera RNA-molekyler som är längre än 70 nukleotider utvinnes användbara RNA-fragment för tillämpningar såsom RT-PCR.

På grund av fixerings- och inbäddningsförhållandena är nukleinsyror i FFPE-prover ofta fragmenterade och kemiskt modifierade av formaldehyd. Därför har nukleinsyror som isolerats från FFPE-prover vanligtvis lägre molekylvikt än DNA från färsk eller frysta prover. Graden av fragmentering beror på provets typ och ålder och förhållandena vid fixering, inbäddning och förvaring av provet. För standardisering av förundersökningsförfaranden av FFPE-vävnad rekommenderar vi att du följer ISO 20166-1:2018 "Molekylärbiologiska in-vitro diagnostiska undersökningar - Riktlinjer för pre-analytiska processer för formalinfixerad och paraffin inbäddad (FFPE) vävnad - Del 1: Isolerat RNA".

Även om formaldehydmodifiering inte kan upptäckas vid standardanalyser för kvalitetskontroll, såsom gelelektrofores eller labb-på-ett-chipp-analys, har det stark påverkan på enzymatiska analyser.

Även om RNeasy DSP FFPE Kit är optimerad att förebygga så mycket av formaldehydmodifieringen som möjligt utan ytterligare RNA-nedbrytning ska inte renade syror från FFPE-prover användas i tillämpningar nedströms som kräver fullängds-RNA. Vissa tillämpningar kan behöva modifieringar för att möjliggöra användning av fragmenterade RNA (t.ex. skapa små ampliconer för RT-PCR). För cDNA-syntes ska antingen slumpmässiga eller genspecifika primers användas istället för oligo-dT-primers.

Färgning av FFPE-snitt kan också försämra RNA-kvalitén och prestandan i tillämpningar nedströms. Detta gäller speciellt för många immunohistokemiska färgningsprotokoll.

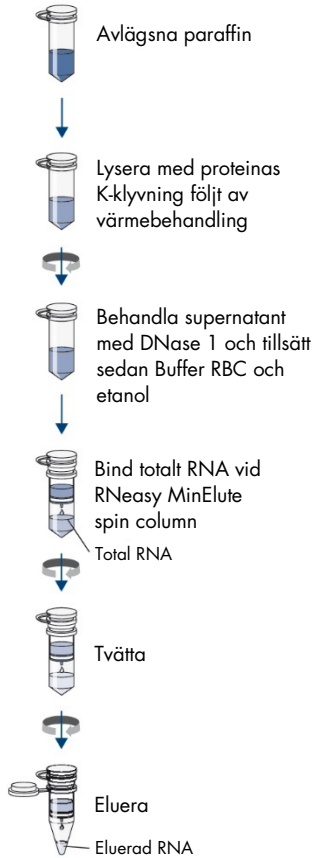
Testprinciper

RNeasy DSP FFPE-principen använder väletablerad RNeasy-teknik för RNA-rening. Speciella optimerade lyseringsförhållanden möjliggör effektiv rening av total RNA från FFPE-vävnadsnitt. Klyvningssteget DNase I avlägsnar effektivt DNA-kontaminering, inklusive mycket fragmenterade molekyler.

Först avlägsnas allt paraffin från FFPE-vävnadsnittet genom behandling med Deparaffinization Solution. Efter det inkuberas proverna i en optimerad lyseringsbuffert som innehåller proteinas K för att frigöra RNA från snitten. En kort inkubation vid högre temperatur förebygger delvis korslänkning av formalin och de frigjorda nukleinsyrorerna, vilket förbättrar RNA-mängd och kvalitet samt RNA-prestanda i enzymatiska analyser nedströms. Detta följs av DNase I-behandling som är optimerad för att eliminera genomiskt DNA, inklusive mycket små DNA-fragment som ofta förekommer i FFPE-prover efter långvarig formalinfixering och/eller långa förvaringstider. Sedan blandas lysatet med Buffer RBC. Etanol tillsätts för att skapa rätt bindningsförhållanden för RNA och provet appliceras sedan på en RNeasy MinElute spin column där total RNA binds vid membranet och kontamineringspartiklar effektivt tvättas bort. RNA elueras sedan i minst 14 µl RNase-fritt vatten.

RNeasy DSP FFPE-förfarande

FFPE-vävnadsnitt



Figur 1. Tillvägagångssätt för RNA-rening från FFPE-vävnad med RNeasy DSP FFPE Kit.

Material som medföljer

Kitinnehåll

| | |
|----------------------------|--------------|
| RNeasy DSP FFPE Kit | (50) |
| Katalognr. | 73604 |
| Antal beredningar | 50 |

| | Identitet | Symboler | Kvantitet |
|----------------------|--|----------------------|------------|
| RNeasy MinElute Spin | RNeasy MinElute® Spin Columns (rosa) (var och en i ett 2 ml provtagningsrör) | COL | 50 |
| ET | Elution Tubes (Elueringsrör) (1,5 ml) | ELU TUBE | 50 |
| LT | Lysis Tubes (Lyseringsrör) (2 ml) | LYS TUBE | 150 |
| WT | Wash Tubes (Tvättrör) (2 ml) | WASH TUBE | 250 |
| DPS | Deparaffinization Solution | DEPAR SOL | 20 ml |
| RBC | Buffer RBC* | BIND BUF | 45 ml |
| PKD | Buffer PKD | PROTK DIL | 15 ml |
| PK | Proteinase K (Proteinas K) | PROTK | 1,25 ml |
| DN | RNase-Free DNase I (frystorkat) | DNase | 1 |
| RNFW | RNase-Free Water (RNase-fritt vatten) | ELU DIL | 3 x 1,5 ml |
| DBB | DNase Booster Buffer | DNase BUF | 2 ml |
| RPE | Buffer RPE† (koncentrat) | WASH BUF CONC | 11 ml |
| HB, v2 | Handbok för RNeasy DSP FFPE Kit | | 1 |

* Innehåller guanidinsalt. Inte kompatibel med desinfektionsmedel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 11.

† Tillsätt 4 volymer etanol (96–100 %, ej denaturerad) före första användning så som anges på flaskan och beskrivs på sidan 16 för att få en fungerande lösning.

Paketets innehåll

De viktigaste komponenterna i kittet förklaras nedan.

Tabell 1. De reagenser som medföljer innehåller aktiva ingredienser

| Reagens | | Komponenter | Volym |
|---------|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| Symbol | Namn | | |
| DPS | Deparaffinization Solution | Hexadekan | ≥90 % till ≤100 % vikt per vikt |
| RBC | Buffer RBC | Guanidinhydroklorid | ≥30 % till 70 % vikt per vikt |
| PKD | Buffer PKD | Ingen | – |
| PK | Proteinase K (Proteinas K) | Proteinas K | ≥1 % till <3 % vikt per vikt |
| DN | RNase-Free DNase I (frysstorkat) | DNase | ≥90 % till ≤100 % vikt per vikt |
| RNFW | RNase-Free Water (RNase-fritt vatten) | Inget | – |
| DBB | DNase Booster Buffer | Ingen | – |
| RPE | Buffer RPE (koncentrat) | Ingen | – |

För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat efter RNA-isolering ska lämpliga kontroller för påföljande tillämpningar användas.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpliga säkerhetsdatablad från produktleverantören för mer information.

Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

- Sterila, RNase-fria pipettspetsar och pipetter
- Mikrocentrifug (med rotor för 2 ml-provrör)
- Vortexblandare
- 96–100 % etanol (använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser, såsom metanol eller metyletylketon)
- Engångshandskar
- Värmeblock med skakfunktion och kapacitet för inkubation vid 56 °C och 80 °C

Varningar och försiktighetsåtgärder

Var medveten om att du kan behöva konsultera lokala regelverk för rapportering av allvariga incidenter som inträffat i samband med enheten till tillverkaren och den tillsynsmyndighet där användaren och/eller patienten befinner sig.

Alla avsedda försiktighetsåtgärder vidtogs när så var möjligt i detta skede av produktutvecklingen och granskades systematiskt. Baserat på riskhantering bedöms alla kvarstående risker som acceptabla och användning av enheten bedöms som säker. Det finns inga kvarvarande risker med RNeasy DSP FFPE Kit.

För in vitro-diagnostisk användning.

Läs alla anvisningar noga innan du använder kittet.

Säkerhetsinformation

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS). Dessa är tillgängliga online i PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut säkerhetsdatablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN.

WARNING

Risk för personskada



Tillsätt ALDRIG blekmedel eller sura lösningar direkt till provberedning.

Buffertarna i RNeasy DSP FFPE Kit innehåller natriumazid. Om dessa buffertar spills rengör du med lämpligt laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den spillda vätskan innehåller potentiellt smittfarliga ämnen rengör du det påverkade området först med laboratorierengöringsmedel och vatten och sedan med natriumhypoklorit 1 % (v/v).

Vid nödsituationer

CHEMTREC

USA och Kanada 1-800-424-9300

Utanför USA och Kanada +1 703 527 3887

Försiktighetsåtgärder

Följande risk- och skyddsmeddelanden gäller för komponenterna i RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNF, DBB

Innehåller: Natriumazid. Varning! Kan vara skadligt vid förtäring. Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du känner dig sjuk.

Deparaffinization Solution



Innehåller: hexadekan. Fara! Kan vara dödligt om det sväljs och når andningsvägarna. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kan orsaka irritation i andningsvägarna. Kan orsaka oåterkalleliga skadliga effekter på marint liv. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRALEN/läkare. Framkalla INTE kräkning. Förvaras inlåst. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning.

Proteinase K



Innehåller: Proteinase K. Fara! Orsakar lindrig hudirritation. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL/läkare. För personen till en plats med frisk luft och placera i ett läge där det är bekvämt att andas. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning.

DNase I



Innehåller: DNase. Fara! Kan orsaka allergisk hudreaktion. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd. Vid exponering eller misstanke om exponering: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL/läkare. För personen till en plats med frisk luft och placera i ett läge där det är bekvämt att andas.

Buffer RBC



Innehåller guanidinhydroklorid. Varning! Skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

DNase Booster Buffer



Varning! Orsakar lindrig hudirritation. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

Förvaring och hantering av reagenser

RNase-Free DNase I och RNeasy MinElute Spin Columns ska förvaras vid 2–8 °C omedelbart efter ankomst. Buffertar kan förvaras i rumstemperatur (15–25 °C). Under dessa förhållanden kan kittet förvaras så som angivet fram till utgångsdatumet på förpackningens etikett utan att prestandan försämras.

Använd inte RNeasy DSP FFPE Kit efter utgångsdatumet.

Användningsstabilitet

Kittet kan användas i 10 månader efter första användning eller fram till utgångsdatumet.

Kitkomponenter

Utgångsdatum för reagenserna anges på etiketterna till varje enskild produkt. Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren har produkten full prestanda under hela stabilitetstiden så länge komponenter från samma batchar används.

För långtidsförvaring av DNase I efter rekonstituering, avlägsna stamlösningen från flaskan, dela upp den i alikvot för engångsanvändning och förvara i –15 till –30 °C i upp till 10 månader. Tinade alikvoter kan förvaras i 2–8 °C i upp till 8 veckor. Frys inte ner upptinade alikvoter.

Undvik att utsätta reagenser för UV-ljus (t.ex. vid sanering) eftersom denna exponering kan påskynda åldrandet.

Förfarande

Viktigt att tänka på före start

Startmaterial

Standardförfaranden för formalinfixering och paraffinbäddning leder alltid till betydande fragmentering och korslänkning av nukleinsyror. Begränsa omfattningen av fragmentering och korslänkning av nukleinsyra genom att:

- Använda vävnadsprover som är tunnare än 5 mm för att formalinet ska kunna penetrera det helt.
- Fixera vävnadsprover i 4–10 % neutral buffrad formalin snarast möjligt efter kirurgisk provtagning
- Använd en maximal fixeringstid på 24 timmar (längre fixeringstider leder till överfixering och allvarligare fragmentering av nukleinsyra, vilket ger dålig prestanda vid nedströmsanalyser)
- Dehydrera proverna ordentligt före inbäddning.
- Använd lågsmältande paraffin till inbäddning

Startmaterialet för RNA-rening ska vara skurna snitt av FFPE-vävnad, vart och ett med en tjocklek på upp till 20 µm. Tjockare snitt kan resultera i mindre mängd utvunnen nukleinsyra även efter förlängd inkubation med proteinas K. Upp till fyra snitt, vart och ett med en tjocklek på upp till 10 µm kan kombineras i en beredning. Fler än fyra snitt kan kombineras om den totala summan av snittens totala tjocklek är 40 µm eller mindre (t.ex. åtta 5 µm tjocka snitt).

För vävnad med extra högt DNA-innehåll rekommenderar vi att färre snitt används per beredning för att undvika DNA-kontaminering av renad RNA.

Om det saknas information om startmaterialets egenskaper rekommenderar vi att du börjar med högst 2 snitt per beredning. Beroende på RNA-mängd och -renhet, kan det vara möjligt att använda upp till 4 snitt i påföljande preparat. Överbelastning av RNeasy MinElute Spin Columns kan dock avsevärt minska mängden och kvalitén hos utvunnen RNA.

Bereda buffertar

Bereda DNase I stamlösning

Bered DNase stamlösning genom att lösa upp det frystorkade DNase I i 550 µl RNase-fritt vatten. För att undvika förlust av DNase I, öppna inte flaskan. Injicera RNase-fritt vatten i flaskan med en RNase-fri nål och spruta. Blanda försiktigt genom att vända flaskan. En vortex bör inte användas för att blanda.

I vissa fall kan flaskan med DNase I verka vara tom. Detta beror på att det frystorkade enzymet sitter fast på septum. För att undvika förlust av DNase I, öppna inte flaskan. Lös istället upp DNase I genom att använda nål och spruta så som beskrivs nedan.

OBS! DNase I är särskilt känsligt för fysisk denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på flaskan.

OBS! Var noga med att se till att hela mängden RNase-fritt vatten injiceras i flaskan.

Olösligt material kan finnas kvar efter att DNase I har lösts upp. På grund av produktionsprocessen kan det finnas olösligt material i frystorkat DNase I. Detta påverkar inte prestandan hos DNase I.

För långtidsförvaring av DNase I ska stamlösningen avlägsnas från flaskan, delas upp i mindre alikvoter för engångsbruk och förvaras i –15 till –30 °C i upp till 10 månader. Tinade alikvoter kan förvaras i 2–8 °C i upp till 8 veckor. Frys inte ner upptinade alikvoter.

Bereda Buffer RPE

Tillsätt fyra volymer (44 ml) etanol (96–100 %) i flaskan som innehåller 11 ml Buffer RPE-koncentrat. Markera kryssrutan på flaskans etikett för att visa att etanol har tillsatts.

OBS! Blanda den rekonstituerade Buffer RPE genom att skaka innan förfarandet påbörjas.

Saker som måste göras före start

- Om RNeasy DSP FFPE Kit används för första gången ska du läsa "Viktigt att tänka på före start" (sidan 15)
- Om du arbetar med RNA för första gången, läs "Bilaga: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering" (sidan 30).
- Buffer RBC innehåller ett guanidinsalt och är därför inte kompatibelt med desinficeringsreagenser som innehåller blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 11.
- Utför alla steg i rumstemperatur (15–25 °C) om ingenting annat anges. Arbeta snabbt under proceduren och gör inga uppehåll.
- Utför alla centrifugeringssteg med en mikrocentrifug inställd på 15–25 °C. Om en kyld mikrocentrifug används, ställ in temperaturen på 20–25 °C eftersom skylning till under 15 °C annars kan inträffa.
- Under förfarandet nedan anger ▲ de volymer som ska användas vid bearbetning av 1–2 snitt per prov medan ● anger de volymer som ska användas vid bearbetning av 3–4 snitt per prov.
- Om Buffer RPE och RNase-Free DNase I används för första gången ska de rekonstitueras på det sätt som beskrivs i "Bereda buffertar" (sidan 16).
- Ekvilibrera alla buffertar till rumstemperatur (15– 25 °C). Blanda rekonstituerad Buffer RPE genom att skaka.
- Ställ in ett värmeblandare på 56 °C för användning i steg 5 och steg 9. Minska väntetiden genom att ställa in en andra värmemixer på 80 °C för användning i steg 9.

- OBS! Gör inte uppehåll i reningsförfarandet eftersom ökade inkubationstider kan innebära förlust eller degradering av RNA. Den genomsnittliga bearbetningstiden för upp till 12 prover parallellt är ca 130 minuter.

Protokoll: Rening av total RNA från FFPE-vävnadsnitt

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell.
2. Skär i 5–20 µm tjocka snitt.
Om provytan har exponerats för luft ska de första 2–3 snitten kasseras.
3. Placera omedelbart snitten i ett mikrocentrifugrör på ▲1,5 eller ●2 ml och stäng locket.
4. Tillsätt ▲ 160 eller ■ 320 µl Deparaffinization Solution, vortexblanda kraftigt i 10 sek och centrifugera kort för att få provet att sjunka till botten av röret.
5. Inkubera i 56 °C i 3 minuter och låt det sedan svalna i 5 min i rumstemperatur.
Om för lite Deparaffinization Solution används eller om för mycket paraffin förs över med provet kan Deparaffinization Solution bli vaxartad eller fast när den svalnat. Om detta sker ska mer Deparaffinization Solution tillsättas i steg på 160 µl och steg 5 upprepas.
6. Tillsätt ▲150 eller ●240 µl Buffer PKD och vortexblanda i 3 sek.
7. Centrifugera i 1 minut på 11 000 x g.
8. Tillsätt 10 µl proteinas K till den lägre, färglösa fasen och blanda genom att försiktigt pipettera 10 gånger upp och ner (blanda inte i separata faser).
9. Inkubera i 56 °C under 15 min på 1100 rpm, sedan i 80 °C under 15 min på 1100 rpm.
Om endast ett värmeblock används ska provet stå i rumstemperatur efter inkubation i 56 °C tills värmeblocket är uppe i 80°C.
OBS! Fullständig digestion av vävnad av proteinas K behövs inte maximalt utbyte av RNA, men inkubationssteget i 80 °C är avgörande.

Viktigt: Se till att värmeblocket har nått 80 °C innan inkubationen på 15 minuter påbörjas. Inkubationen under 15 min. i 80 °C är avgörande för att motverka korslänkar av formaldehyd och optimal RNA-prestanda nedströms såsom vid RT-PCR i realtid.

10. Centrifugera kort och överför ▲ 145 eller ● 230 µl av den lägre, färglösa fasen till ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugrör.
11. Inkubera på is i 3 min. och centrifugera sedan i 15 min på 20 000 x g.
12. Överför supernatant till ett nytt 2 ml mikrocentrifugrör och se till att inte rubba pelleten. Pelleten innehåller olösligt vävnadsavfall, bland annat korslänkade DNA.
13. Tillsätt DNase Booster Buffer motsvarande en tiondel av provets volym (▲ 14,5 eller ● 23 µl) samt 10 µl DNase I stamlösning. Blanda genom att vända provröret. Centrifugera en kort stund för att samla upp kvarvarande vätska från rörets sidor. OBS! DNase I tillhandahålls frystorkad och måste rekonstitueras såsom beskrivs i "Bereda DNase I stamlösning" på sidan 16.
OBS! DNase I är särskilt känsligt för denaturering. Blanda endast genom att försiktigt vända på röret. En vortex bör inte användas för att blanda.
14. Inkubera i rumstemperatur i 15 minuter.
15. Tillsätt ▲ 320 eller ● 500 µl Buffer RBC för att anpassa bindningsförhållandena och blanda lysatet noga med vortexblandare i 3 sekunder samt centrifugera kort.
16. Tillsätt ▲720 µl eller ■1200 µl etanol (96–100 %) till provet. Centrifugera inte. Gå sedan omedelbart vidare till steg 17.
Ett precipitat kan vara synlig efter att etanol har tillsatts. Detta påverkar inte proceduren.
17. Blanda väl genom att pipettera 5 gånger upp och ner och överför 700 µl av provet, inklusive eventuell precipitat som kan ha bildats, till en RNeasy MinElute spin column i ett 2 ml provtagningsrör. Stäng försiktigt locket och centrifugera i 15 sek på ≥8000 x g. Kassera provtagningsröret med den genomströmmade vätskan* och placera kolonnen i ett nytt provtagningsrör (medföljer).

*Den genomströmmade vätskan innehåller Buffer RBC och är därför inte kompatibel med blekmedel. Säkerhetsinformation 8finns på sidan .

18. Upprepa steg 17 (utan ytterligare blandning) tills hela provet har passerat genom RNeasy MinElute spin column.
19. Tillsätt 500 µl Buffer RPE i RNeasy MinElute spin column. Stäng försiktigt locket och centrifugera i 15 sek på $\geq 8000 \times g$. Kassera provtagningsröret med den genomströmmade vätskan* och placera kolonnen i ett nytt provtagningsrör (medföljer). OBS! Buffer RPE levereras som ett koncentrat. Se till att etanol tillsätts före användning såsom beskrivs i "Bereda Buffer RPE".
20. Tillsätt 500 µl Buffer RPE i RNeasy MinElute spin column. Stäng locket försiktigt och centrifugera i 2 minuter på $\geq 8000 \times g$ för att tvätta membranet på kolonnen. Kassera provtagningsröret med den genomströmmade vätskan* och placera kolonnen i ett nytt provtagningsrör (medföljer).
OBS! Ta försiktigt bort RNeasy MinElute spin column från provtagningsröret efter centrifugeringen så att kolonnen inte kommer i kontakt med den genomströmmade vätskan. Om detta sker kommer etanol att överföras.
21. Öppna locket till kolonnen och centrifugera i full hastighet i 5 minuter. Kassera provtagningsröret med den genomströmmade vätskan.
För att undvika att locken på kolonnerna skadas placerar du kolonnerna i centrifugen med minst en tom position mellan varje kolonn. Rikta locken så att de pekar i motsatt riktning mot rotorns rotation (om t.ex. rotorn roterar medurs riktar du locken moturs).
Det är viktigt att du torkar av membranet på kolonnen eftersom rester av etanol kan påverka reaktionerna nedströms. Centrifugering med öppna lock säkerställer att ingen etanol överförs under RNA-eluering.
22. Placera RNeasy MinElute spin column i ett nytt 1,5 ml provtagningsrör (medföljer). Tillsätt 14–32 µl RNase-fritt vatten direkt i mitten av kolonnens membran. Stäng locket försiktigt och centrifugera i full hastighet i 1 minut för att eluera RNA:t.

* Den genomströmmade vätskan innehåller Buffer RBC och är därför inte kompatibel med blekmedel. Säkerhetsinformation 8finns på sidan .

Eluering med mindre volymer av RNase-fritt vatten leder till högre total RNA-koncentrationer men med mindre RNA-utbyte.

OBS! För förväntat lågt utbyte av RNA kan ett lågbindande provrör användas för eluering (medföljer inte). Den genomsnittliga döda volymen i RNeasy MinElute spin column är 2 µl. Eluering med 14 µl RNase-fritt vatten resulterar i ca 12 µl eluat.

23. Förvara RNA-eluate i -60 till -90 °C eller i -15 till -30 °C i upp till 12 veckor.

OBS! Eluatstabiliteten beror på innehållet och typen av isolerade RNA, elueringsvolym och förvaringsförhållanden. Vi rekommenderar att användare fastställer eluatstabiliteten efter behov för sina specifika krav.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje parti av RNeasy DSP FFPE Kit med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringssystem.

Begränsningar

Systemprestandan har fastställts i prestandautvärderingsstudier vid rening av human RNA från formalinfixerade, paraffinbäddade prover.

Det är användarens ansvar att validera systemets prestanda för procedurer som används i deras laboratorium och som inte ingår i QIAGEN:s prestandautvärderingsstudier.

För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat bör lämpliga kontroller för nedströmstillämpningar användas.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd.

Prestandaegenskaper

Tillämpliga prestandaegenskaper finns under resursfliken på produktsidan på www.qiagen.com.

Bortskaffning

Avfallet innehåller prover och reagenser. Detta avfall kan innehålla giftigt eller smittsamt material och måste avyttras på lämpligt sätt. Se dina lokala säkerhetsföreskrifter för lämpliga avyttringsprocedurer.

Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (safety data sheets, SDS). Dessa är tillgängliga online i PDF-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut säkerhetsdatablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN.

Felsökningshandbok

Den här felsökningshandboken kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som uppstår. Mer information finns på sidan Vanliga frågor (Frequently Asked Questions, FAQ) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar QIAGEN tekniska service gärna på frågor om informationen och/eller protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, besök www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag

Igensatt RNeasy MinElute spin column

- | | |
|---------------------------------------|---|
| a) För mycket startmaterial | Minska mängden startmaterial. Det är viktigt att använda rätt mängd startmaterial (se sidan 15). |
| b) För låg centrifugerings temperatur | Centrifugerings temperaturen ska vara 15–25 °C. Vissa centrifuger kan bli kallare än 15 °C även när de är inställda på 20 °C. Detta kan orsaka igensättning av RNeasy MinElute spin column. Om detta sker ska centrifugerings temperaturen ökas till 25 °C. |
-

Lågt RNA-utbyte

- | | |
|---|--|
| a) Dålig kvalitet på startmaterial | Prov som varit fixerade i mer än 24 timmar eller som lagrats under långa perioder kan innehålla väldigt liten mängd RNA. Snitt som monterats på objektglas för mikroskop kan ge väldigt liten mängd RNA på grund av långvarig syreexponering. |
| b) För mycket startmaterial | Överbelastning av RNeasy MinElute spin column minskar avsevärt mängden nukleinsyra. Minska mängden startmaterial (se sidan 15). |
| c) RNA är fortfarande bunden till membranet i RNeasy MinElute spin column | Upprepa RNA-elueringen men inkubera RNeasy MinElute spin column på bänken i 10 minuter med RNFV före centrifugering. |
| d) Felaktig förvaring av buffert/reagens | RNeasy MinElute Spin Columns och DNase I måste förvaras i 2–8 °C från mottagande av kittet. Kontrollera att förvarings temperaturen är korrekt eftersom funktionen försämras om det exponeras för högre temperaturer under längre tid. |
-

Lågt A_{260}/A_{280} -värde

Vatten används för att späda nukleinsyra för A_{260}/A_{280} -mätning Använd 10 mM Tris Cl, pH 7.5, inte vatten, för att späda provet innan renheten mäts.

DNA-kontaminering i experiment nedströms

- a) För mycket startmaterial För vissa vävnadstyper kan effektiviteten hos DNA-avlägsnande minska när de behandlas med mycket stora mängder. Prova att bearbeta färre vävnadssnitt per gägg om eluerad RNA innehåller avsevärd DNA-kontaminering.
- b) Vävnaden har högt DNA-innehåll Vid bearbetning av stora mängder vävnad med högt DNA-innehåll (t.ex. tymus) kanske inte DNA:t bryts ner helt. Upprepa reningsprocessen med ett mindre antal vävnadssnitt.
Kontrollera att DNase I har förvarats korrekt på det sätt som beskrivs i "Förvaring och hantering av reagens" och "Beredning av DNase I stamlösning".
- c) Omvänd transkription med otillräcklig mängd RNA Omvänt transkriptas är för det mesta avsett att användas med 1 µg RNA. Om omvänt transkription utförs med ytterst små mängder RNA rekommenderar vi att ett omvänt transkriptas används som är speciellt utformat för mycket känslig omvänt transkription.
-

RNA fungerar inte bra i nedströmsanalys/-tillämpningar

- a) RNA är fragmenterad eller blockerad på grund av formaldehydmodifiering Inkubationen i 80 °C under RNeasy DSP FFPE-processen är avgörande för optimal RNA-prestanda vid omvänt transkription och andra enzymatiska tillämpningar nedströms. Säkerställ att inkubationstemperaturen bibehålls på 80 °C under hela den 15 minuter långa inkubationstiden.
Även om inkubationen i 80 °C avlägsnar en del av formaldehydmodifieringarna är inte RNA som renats från FFPE-snitt optimala för enzymatiska reaktioner. Vi rekommenderar att endast slumpmässig primer eller genspecifik primer används för cDNA-syntes. Vi rekommenderar också att amplikoner hålls så korta som möjligt för PCR (<500 nukleotider).
- b) Överföring av etanol Se till att centrifugera på $\geq 8000 \times g$ i 2 minuter och 15–25 °C under den andra tvätten med Buffer RPE för att torka RNeasy MinElute spin column membran. Ta försiktigt bort kolonnen från provtagningsröret efter centrifugeringen så att kolonnen inte kommer i kontakt med den genomströmmade vätskan. Placera sedan kolonnen i ett nytt provtagningsrör och centrifugera i full hastighet i 5 minuter.








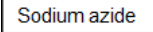

Kommentarer och förslag

- | | |
|--|---|
| c) Överföring av salt under RNA-eluering | Säkerställ att Buffer RPE rekonstituerades genom att korrekt mängd etanol tillsatts och att bufferten har rumstemperatur (15–25 °C). |
| d) Omvänd transkription med otillräcklig mängd RNA | Omvänt transkriptas är för det mesta avsett att användas med 1 µg RNA. Om omvänd transkription utförs med ytterst små mängder RNA rekommenderar vi att ett omvänt transkriptas används som är speciellt utformat för mycket känslig omvänd transkription. |

Symboler

Nedanstående symboler finns i användningsinstruktionerna eller på förpackningar och etiketter:

| Symbol | Symbolförklaring |
|---|--|
|  Σ <N> | Innehåller reagens som räcker till <N> reaktioner |
|  | Utgångsdatum |
|  | Den här produkten uppfyller kraven i Europeisk Regel 2017/746 för in vitro-diagnostiska medicintekniska enheter. |
|  | In vitro-diagnostisk medicinteknisk enhet |
|  | Vid ankomst |
|  | DN |
|  | RNeasy MinElute Spin |
|  | Katalognummer |
|  | Lotnummer |
|  | Materialnummer (dvs. komponentetikett) |
|  | Komponenter (dvs. en lista över vad som ingår) |
|  | Innehåller (innehåll) |

| Symbol | Symbolförklaring |
|--|---|
|  | Antal (dvs. vialer, flaskor) |
|  | GSI-artikelnnummer |
| Rn | R betyder revidering av bruksanvisningen (handboken) och n är revisionsnumret |
|  | Temperaturbegränsning |
|  | Tillverkare |
|  | Läs bruksanvisningen |
|  | lakttag försiktighet |
|  | Proteinas K |
|  | Natriumazid |
|  | Unik enhetsidentifierare |

Kontaktinformation

För teknisk support och ytterligare information är du välkommen att besöka vårt tekniska supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringa oss på 00800- 22- 44- 6000 eller kontakta QIAGEN teknisk service eller en lokal distributör (se baksidan eller besök www.qiagen.com).

Bilaga: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering

Arbeta med RNA

Ribonukleaser (RNaser) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att fungera. RNaser är svåra att inaktivera och endast en liten mängd räcker för att bryta ner RNA. Därför skall inga laboratoriematerial av glas eller plast användas, där RNase-kontaminationer inte eliminerats först. Se till att RNA-proven inte kontamineras med RNase under eller efter reningsproceduren. För att skapa och upprätthålla en RNase-fri omgivning bör följande försiktighetsåtgärder vidtas vid förbehandling och användning av engångs- och flegångsbehållare och lösningar när du arbetar med RNA.

Allmän hantering

Arbetet med RNA ska alltid följa principerna för korrekt mikrobiologisk aseptiska teknik. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontamination. För att undvika RNase-kontamination via huden eller genom dammiga laboratorieinstrument, bör du därför alltid bära latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser eller RNA-prover. Byt laboratoriehandskarna ofta och stäng alltid alla rör direkt efter användning. Låt renat RNA ligga kvar på is, om aliquoter pipetteras för nedströmstillämpningar.

Vi rekommenderar att RNase-kontaminering från bänkytor, plastartiklar för flegångsbruk och laboratorieutrustning (t.ex. pipetter och elektroforestankar) avlägsnas med RNaseZap® (katalognr. AM9780) från Ambion®. RNase-kontaminering kan alternativt avlägsnas med allmänna laboratorieagenser. Dekontaminera plastartiklar genom att skölja dem med 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA följt av RNase-fritt vatten (se "Lösningar" på sidan 32) eller skölj med kloroform om plastartiklarna är kloroformresistenta. Dekontaminera elektroforestankar genom att rengöra dem med rengöringsmedel (t.ex. 0,5 % SDS), skölj med RNase-fritt vatten, skölj med etanol (om tankarna är etanolresistenta) och låt torka.

Plastvaror för engångsbruk

Användning av sterila polypropylenprovror för engångsbruk rekommenderas för hela proceduren. Provrören är generellt RNase-fria och behöver ingen förbehandling för att inaktivera RNase.

Glasartiklar

Glasartiklar ska behandlas före användningen för att säkerställa att de är RNase-fria. Glasartiklar som ska användas för RNA-arbete ska rengöras med rengöringsmedel, sköljas noga och ugnbehandlas i 240 °C i minst fyra timmar (över natten, om det är mer bekvämt) före användning. Enbart autoklivering kommer inte helt att inaktivera många RNaser. Alternativt kan glaset behandlas med DEPC (dietylpyrokarbonat) såsom beskrivs i "Lösningar" nedan.

Lösningar

Lösningar (vatten och andra lösningar) ska behandlas med 0,1 % DEPC. DEPC är en stark, men inte en absolut, hämmare av RNaser. Det används ofta vid en koncentration på 0,1 % för att inaktivera RNaser på glas eller plast, eller för att bilda RNase-fria lösningar och vatten. DEPC inaktiverar RNaser genom kovalent modifiering. Tillsätt 0,1 ml DEPC i 100 ml av den lösning som ska behandlas och skaka ordentligt för att blanda DEPC med lösningen. Låt lösningen inkubera i 12 timmar och 37°C. Autoklavera i 15 minuter för att avlägsna eventuella spår av DEPC. DEPC reagerar med primäraminerna och kan inte användas direkt för att behandla Tris-buffertar. DEPC är mycket instabilt i närvaro av Tris-buffert och bryts snabbt ned till etanol och CO₂. Vid preparering av Tris-buffertar ska vattnet först behandlas med DEPC och därefter ska Tris lösas upp för att bilda lämplig buffert. Spårbara mängder DEPC modifiera purina rester i RNA genom karboxylering. Karboxylerat RNA förflyttas med mycket låg effektivitet i cellfria system. Dess förmåga att bilda DNA:RNA- eller RNA:RNA-hybrider påverkas emellertid inte allvarligt, såvida inte en stor fraktion av purina rester har modifierats. Rester av DEPC måste alltid avlägsnas från lösningar och kärl genom autoklivering eller uppvärmning till 100 °C i 15 minuter.

OBS! RNeasy-buffertar är garanterat RNase-fria utan DEPC-behandling och är således fria från DEPC-kontaminering.

Beställningsinformation

| Produkt | Innehåll | Kat.nr. |
|--------------------------|---|---------|
| RNeasy DSP FFPE Kit (50) | 50 RNeasy MinElute Spin Columns, elueringsrör, tvättrör, lyseringsrör, RNase-fria reagenser och buffertar | 73604 |

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive handbok eller användarmanual för QIAGEN-kittet. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-satsen finns tillgängliga på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN teknisk service eller din lokala återförsäljare.

Dokumentrevisioner

| Revision | Beskrivning |
|---------------|--|
| R1, juni 2022 | <p data-bbox="409 360 992 448">Uppdatering av Kit Version 2 för IVDR-efterlevnad. Inga ändringar av protokoll eller prestanda jämfört med Kit Version 1</p> <p data-bbox="409 480 992 584">Uppdatering av Varningar och försiktighetsåtgärder (tillägg om kvarvarande risker och information vid nödsituationer)</p> <p data-bbox="409 608 725 636">Avsnittet Avyttring har lagts till</p> |

Avtal om begränsad licens för RNeasy DSP FFPE Kit

Användning av denna produkt innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och denna handbok och får endast användas med komponenterna som ingår i satsen. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit, förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. Dessa protokoll har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
1. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att denna sats och/eller dess användning inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Satsen och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
3. QIAGEN avsäger sig specifikt ansvar för alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, förutom de uttryckligen angivna.
4. Inköparen och användaren av denna sats samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende satsen och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], MinElute[®], RNeasy[®] (QIAGEN-gruppen); Ambion[®], RNaseZap[®] (Thermo Fisher Scientific eller dess dotterbolag). 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-3027-001 1 127532SV © 2022 QIAGEN, med ensamrätt.

