

Luty 2017

Zestaw QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue — Instrukcja obsługi



Wersja 1



Do stosowania w diagnostyce in vitro



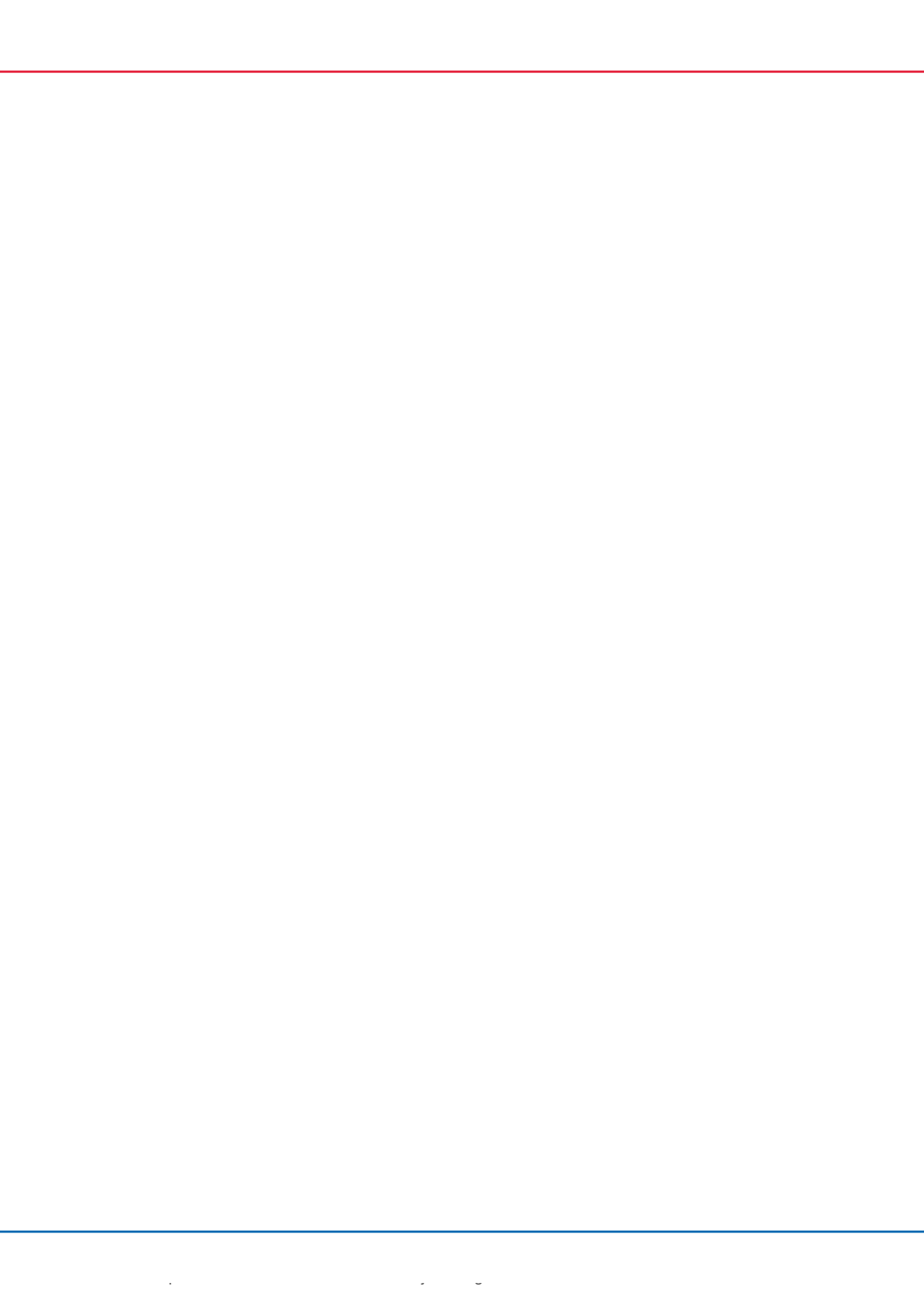
60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NIEMCY



R3 1062689PL



Spis treści

Przeznaczenie	5
Streszczenie i informacje ogólne	5
Zasada realizacji procedury	6
Materiały dostarczone w zestawie	8
Zawartość zestawu	8
Materiały wymagane, ale niedostarczone	9
Ostrzeżenia i środki ostrożności	10
Przechowywanie odczynników i sposób postępowania	11
Sposób postępowania z próbkami i przechowywanie ich.....	12
Procedura	13
Przygotowanie buforów	14
Materiał wyjściowy	15
Unikanie zanieczyszczenia krzyżowego	16
Odwirowanie	17
Przetwarzanie kolumn QIAamp MinElute w mikrowirówce.....	17
Wymywanie oczyszczonego DNA	18
Protokół: izolacja genomowego DNA ze skrawków tkankowych FFPE.....	19
Kontrola jakości	23
Ograniczenia	23
Charakterystyka działania zestawu	24
Symbole.....	24
Informacje kontaktowe.....	25
Dane do zamówień	26

Przeznaczenie

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue jest systemem wykorzystującym technologię membrany krzemionkowej (technologię QIAamp) do izolacji i oczyszczania genomowego DNA z próbek biologicznych utrwalonych w formalinie i zatopionych w parafinie (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).

Produkt jest przeznaczony do stosowania przez użytkowników profesjonalnych, takich jak technicy i lekarze, przeszkolonych w dziedzinie technik biologii molekularnych stosowanych w diagnostyce in vitro (in vitro diagnostics, IVD); służy do ręcznego przygotowywania próbek i nie generuje żadnych, ani jakościowych, ani ilościowych, wyników testów.

Streszczenie i informacje ogólne

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue służy do oczyszczania DNA ze skrawków tkankowych FFPE. Korzysta ze sprawdzonej technologii QIAamp DNA Micro służącej do oczyszczania genomowego i mitochondrialnego DNA z próbek o małych objętościach lub rozmiarach. Zestaw łączy wybiórcze własności wiążące membrany krzemionkowej z elastycznymi objętościami wymywania.

Warunki lizy pozwalają na skuteczne oczyszczanie genomowego DNA ze skrawków tkankowych FFPE bez konieczności pozostawiania ich na noc do inkubacji. Inkubacja w podwyższonej temperaturze po trawieniu proteinazą K częściowo usuwa wiązania krzyżowe uwolnionego DNA pod wpływem utrwalenia formaliną, potencjalnie zwiększając uzysk i poprawiając charakterystykę DNA w dalszych testach. Należy zwrócić uwagę, że DNA wyizolowany z próbek FFPE ma zwykle niższą masę cząsteczkową niż DNA z próbek świeżych lub mrożonych. Stopień fragmentacji zależy od typu i wieku próbki oraz warunków utrwalania.

Prostą procedurę QIAamp DSP DNA FFPE Tissue można stosować do jednoczesnej obróbki wielu próbek poddanych wcześniej lizie.

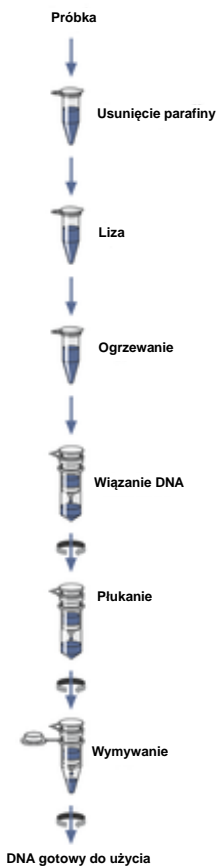
Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację wydajności systemu do wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami wydajności wykonanymi przez firmę QIAGEN i opisanymi w instrukcji obsługi.

Zasada realizacji procedury

Procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue składa się z sześciu kroków (Rysunek 1):

- Usunięcie parafiny: parafina jest rozpuszczana w ksylenie i usuwana
- Liza: próbka jest poddawana lizie w temperaturze 56°C, w warunkach denaturacji, w obecności proteiny K
- Obróbka cieplna: inkubacja w temperaturze 90°C odwraca reakcję wiązania krzyżowego powstałego w wyniku utrwalenia formaliną
- Wiązanie: DNA wiąże się z membraną, a zanieczyszczenia przepływają, tworząc przesącz
- Płukanie: pozostałości zanieczyszczeń są wypłukiwane
- Wymycie: czysty koncentrat DNA jest wymywany z membrany




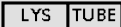



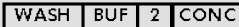



QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



Rysunek 1. Procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Materiały dostarczone w zestawie

Zawartość zestawu

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Nr katalogowy			60404
Liczba reakcji			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Kolumny QIAamp MinElute z probówkami do płukania)		50
WT	Wash Tubes (Probówki do płukania) (2 ml)		3 x 50
ET	Elution Tubes (Probówki do wymywania) (1,5 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Probówki do lizy) (2 ml)		50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Bufor do lizy tkanek)		10 ml
AL	Lysis Buffer* (Bufor do lizy)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Bufor płuczący) (koncentrat)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Bufor płuczący 2) (koncentrat)		13 ml
ATE	Elution Buffer† (Bufor wymywający)		12 ml
PK	Proteinaza K		1,25 ml
–	Instrukcja użycia (Instrukcja obsługi)		1

* Zawiera sól guanidyny. Produkt niekompatybilny ze środkami dezynfekującymi zawierającymi wybielacz. Należy zapoznać się z ostrzeżeniami i środkami ostrożności opisanymi na stronie 10.

† Zawiera azydek sodu jako środek konserwujący.

Materiały wymagane, ale niedostarczone

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

Odczynniki

- Ksylen
- Etanol (96–100%)*

Materiały eksploatacyjne

- Jeśli użytkownik postanowi nie korzystać z probówek dostarczonych w zestawie, zalecamy użycie probówek o pojemności 1,5 ml lub 2 ml do mikrowirówki (w krokach lizy) i probówek o pojemności 1,5 ml do mikrowirówki (w krokach wmywania). Probówki takie dostępne są w firmach Eppendorf® [Safe-Lock: nr kat. 022363204 w USA; nr kat. 0030 120.086 w Europie] i Sarstedt [nr. kat. 72.690]). Zalecamy użycie probówek stożkowych niezanieczyszczonych DNazami/RNazami i zaopatrzonych w szczelne zatyczki.
- Pipety i końcówki do pipet (zdecydowanie zalecamy stosowanie końcówek do pipet z barierami aerozolowymi w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego)

Wyposażenie

- TermoMixer[†], podgrzewany inkubator z funkcją ruchu orbitalnego, blok grzewczy lub łaźnia wodna umożliwiająca inkubację w temperaturach 56°C, 70°C i 90°C
- Mikrowirówka[†] (z wirnikiem do probówek 2 ml)
- Mieszalnik

* Nie używać denaturatu, który oprócz etanolu zawiera inne substancje, takie jak metanol lub metyloetyloketon.

[†] W celu zapewnienia właściwej obróbki próbek w procedurach QIAamp DSP DNA FFPE zdecydowanie zalecamy, aby instrumenty były kalibrowane zgodnie z zaleceniami ich producentów.

Ostrzeżenia i środki ostrożności

Do stosowania w diagnostyce in vitro

W czasie pracy ze środkami chemicznymi należy zawsze używać odpowiedniego fartucha laboratoryjnego, rękawiczek jednorazowych i okularów ochronnych. W celu uzyskania dodatkowych informacji należy zapoznać się z kartami charakterystyki (SDS). Są one dostępne w internecie w wygodnym formacie PDF pod adresem www.qiagen.com/safety. Na tej stronie można wyszukiwać, wyświetlać i drukować karty charakterystyki dla wszystkich zestawów i składników zestawów firmy QIAGEN®.



OSTRZEŻENIE: NIE WOLNO dolewać wybielacza lub roztworów kwasowych bezpośrednio do odpadów powstałych z przygotowywania próbki.

Bufor AL i bufor AW1 zawierają chlorowodorek guanidyny, który może tworzyć wysoce reaktywne związki w połączeniu z wybielaczem.

W przypadku rozlania płynu zawierającego te bufora należy wyczyścić go za pomocą odpowiedniego detergentu laboratoryjnego i wody. Jeśli rozlany płyn zawiera czynniki potencjalnie zakaźne, należy wyczyścić zalany obszar najpierw detergentem laboratoryjnym i wodą, a następnie 1-procentowym (v/v) podchlorynem sodu.

W odniesieniu do składników zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue obowiązują następujące zwroty wskazujące niebezpieczeństwa i środki ostrożności.

Bufor AL



Zawiera chlorowodorek guanidyny, kwas maleinowy. Uwaga! Może działać szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania. Działa drażniąco na skórę. Działa drażniąco na oczy. Może powodować reakcję alergiczną skóry. W przypadku utrzymywania się działania drażniącego na oczy: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy.

Bufor ATL



Uwaga! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry: zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza.

Bufor AW1



Zawiera chlorowodorek guanidyny. Uwaga! Działa szkodliwie po połknięciu lub w następstwie wdychania. Działa drażniąco na skórę. Działa drażniąco na oczy. W przypadku złego samopoczucia skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUC lub z lekarzem. Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu likwidacji odpadów. Zanieczyszczoną odzież zdjąć i wyprać przed ponownym użyciem. Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy

Proteinaza K



Zawiera: Proteinaza K. Niebezpieczeństwo! Powoduje łagodne podrażnienie skóry. Może powodować objawy alergii lub astmy lub trudności w oddychaniu w następstwie wdychania. Unikać wdychania pyłu/dymu/gazu/mgły/par/rozpylonej cieczy. Zawartość/pojemnik usuwać do zatwierzonego zakładu likwidacji odpadów. W przypadku wystąpienia objawów ze strony układu oddechowego: Skontaktować się z OŚRODKIEM ZATRUC lub z lekarzem. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO DRÓG ODDECHOWYCH: W przypadku trudności z oddychaniem, wyprowadzić lub wynieść poszkodowanego na świeże powietrze i zapewnić warunki do odpoczynku w pozycji umożliwiającej swobodne oddychanie. Stosować indywidualne środki ochrony dróg oddechowych.

Przechowywanie odczynników i sposób postępowania

Kolumny QIAamp MinElute po odebraniu zawierającej je dostawy powinny być przechowywane w temperaturze 2–8°C i mogą być używane do terminu ważności podanego na pudełku zestawu.

Wszystkie bufora mogą być przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C) i są stabilne do terminu ważności zestawu. Jednak zrekonstruowany bufor AW1 i AW2 można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez maksymalnie 1 rok lub do terminu ważności zestawu, zależnie od tego, który z tych terminów upłynie wcześniej.

Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue zawiera gotowy do użycia roztwór proteiny K dostarczony w buforze do przechowywania o specjalnej formule. Proteinaza K przechowywana w temperaturze pokojowej (15–25°C) jest stabilna do terminu ważności zestawu.

Sposób postępowania z próbkami i przechowywanie ich

Powinno się stosować standardowe procedury utrwalania w formalinie i zatapiania w parafinie, a w celu ograniczenia fragmentacji DNA należy koniecznie:

- Utrwalać tkanki w formalinie zgodnie z protokołem laboratoryjnym (powszechnie za odpowiedni uznaje się 10-procentowy buforowany obojętny roztwór formaliny) jak najszybciej po pobraniu chirurgicznym.
- Utrwalać przez 14–24 godziny. Ograniczać czas utrwalania, ponieważ przedłużone utrwalanie (na przykład >24 godziny) może zwiększyć stopień fragmentacji DNA, prowadząc do pogorszenia charakterystyki materiału w dalszych testach.
- Przed zatopieniem dokładnie odwodnić próbki (pozostałości formaliny mogą hamować trawienie proteiną K).

DNA jest wymywany w buforze ATE i od razu gotowy do użycia w reakcjach amplifikacji lub do przechowywania (warunki zależą od wymagań użytkownika). Zalecane warunki przechowywania właściwe dla dalszych zastosowań konkretnych produktów QIAGEN opisano w instrukcjach obsługi odpowiednich zestawów.

Procedura

Ważne informacje przed rozpoczęciem

- Wszystkie odczynniki dostarczone w zestawie QIAamp DSP DNA FFPE Tissue są przeznaczone wyłącznie do stosowania z innymi odczynnikami z tego samego zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Aby utrzymać optymalną wydajność zestawu, nie należy zamieniać odczynników.
- Po otrzymaniu zestawu należy sprawdzić elementy zestawu pod kątem uszkodzeń. Jeśli uszkodzone są opakowania blistrowe lub butelki z buforami, należy skontaktować się z działem pomocy technicznej firmy QIAGEN lub lokalnym dystrybutorem. W przypadku rozlania płynów należy zapoznać się z punktem „Ostrzeżenia i środki ostrożności”, strona 10. Nie używać uszkodzonych elementów zestawu, ponieważ ich użycie może prowadzić do słabego działania zestawu.
- Nie używać elementów innych zestawów z aktualnie używanym zestawem, chyba że numery serii są identyczne.
- Należy unikać zanieczyszczenia mikrobiologicznego odczynników zestawu.
- Zestaw powinien być stosowany wyłącznie przez personel przeszkolony w zakresie laboratoryjnych procedur diagnostycznych in vitro.
- Podczas posługiwania się odczynnikami i próbkami należy zawsze nosić lateksowe lub winylowe rękawiczki, aby uniknąć zanieczyszczenia powierzchniami skóry lub zakurzonymi urządzeniami laboratoryjnymi. Dłonie i cząsteczki kurzu przenoszą bakterie i pleśnie oraz stanowią częste źródła zanieczyszczenia. Rękawiczki należy często zmieniać, a próbówki trzymać zamknięte.
- Niezużyte bufony, zlewki zawierające przesącz i pozostałości próbki należy utylizować zgodnie z lokalnymi procedurami.

- Jeśli użytkownik używa własnych naczyń laboratoryjnych z tworzywa sztucznego, to na wszystkich etapach procedury oczyszczania zalecane jest używanie jednorazowych stożkowych, niskowiążących probówek polipropylenowych o pojemności 1,5–2 ml, niezanieczyszczonych DNazami/RNazami.
- Wszystkie kroki odwirowywania wykonywać w temperaturze pokojowej (15–25°C).
- Wszystkie bufor powinny być przechowywane w temperaturze pokojowej (15–25°C), a przed użyciem należy je dokładnie wymieszać.
- Ustawić termomikser lub podgrzewany inkubator z funkcją ruchu orbitalnego na 56°C, do wykorzystania w kroku 11. Jeśli termomikser lub podgrzewany inkubator z funkcją ruchu orbitalnego nie jest dostępny, można w zastępstwie użyć bloku grzewczego lub łaźni wodnej.
- Jeśli bufor AL lub bufor ATL zawiera wytrącone osady, należy je rozpuścić, podgrzewając do 70°C i jednocześnie delikatnie poruszając.
- Bufor AW1 i bufor AW2 koniecznie przygotować według poniższej instrukcji.
- Procedury kontroli jakości stosowane w firmie QIAGEN obejmują test działania testów z każdej partii. Dlatego nie wolno mieszać odczynników z różnych partii ani używać kombinacji odczynników pochodzących z różnych partii.

Przygotowanie buforów

Przygotowanie buforu ATL

- Przed rozpoczęciem procedury sprawdzić, czy w buforze ATL wytrącił się osad. W razie potrzeby rozpuścić go, ogrzewając do 70°C i jednocześnie delikatnie poruszając.

Przygotowanie buforu AL

- Przed rozpoczęciem procedury sprawdzić, czy w buforze AL wytrącił się osad. W razie potrzeby rozpuścić go, ogrzewając do 70°C i jednocześnie delikatnie poruszając.

Przygotowanie buforu AW1

- Dodać 25 ml etanolu (96–100%) do butelki zawierającej 19 ml stężonego buforu AW1. Zaznaczyć na etykiecie butelki, że etanol został dodany. Zrekonstruowany bufor AW1 można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez maksymalnie 1 rok lub do terminu ważności zestawu, zależnie od tego, który z tych terminów upłynie wcześniej. Zalecamy zapisanie daty rekonstrukcji na etykiecie buforu.

Uwaga: Przed rozpoczęciem procedury wymieszać zrekonstruowany bufor AW1 poprzez potrząsanie.

Przygotowanie buforu AW2

- Dodać 30 ml etanolu (96–100%) do butelki zawierającej 13 ml stężonego buforu AW2. Zaznaczyć na etykiecie butelki, że etanol został dodany. Zrekonstruowany bufor AW2 można przechowywać w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez maksymalnie 1 rok lub do terminu ważności podanego na zestawie, zależnie od tego, który z tych terminów upłynie wcześniej. Zalecamy zapisanie daty rekonstrukcji na etykiecie buforu.

Uwaga: Przed rozpoczęciem procedury wymieszać zrekonstruowany bufor AW2 poprzez potrząsanie.

Materiał wyjściowy

Materiałem wyjściowym do oczyszczania DNA są cięte skrawki tkanki utrwalone w formalinie i zatopione w parafinie (FFPE), najlepiej od razu po cięciu. Możliwe jest połączenie więcej niż jednego skrawka w jeden preparat. Jeśli brak jest informacji o charakterze materiału wyjściowego, zalecamy rozpoczęcie od nie więcej niż trzech skrawków na jeden preparat.

Użytkownik powinien zoptymalizować liczbę, grubość i pole powierzchni skrawków z uwzględnieniem procedur realizowanych w swoim laboratorium. Jeśli zestaw używany jest razem z produktem QIAGEN do dalszej analizy, należy zapoznać się z informacjami zamieszczonymi w odpowiedniej instrukcji obsługi.

Unikanie zanieczyszczenia krzyżowego

Z powodu czułości technologii amplifikacji kwasu nukleinowego podczas postępowania z kolumnami QIAamp MinElute konieczne jest stosowanie następujących środków ostrożności dla uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami:

- Nie umieszczać w probówce zbyt dużej ilości tkanki.
- Zeskrobuując tkankę, zmieniać skalpel między kolejnymi próbkami.
- Ostrożnie nanosić próbkę lub roztwór na kolumnę QIAamp MinElute. Próbkę nanieść pipetą do kolumny QIAamp MinElute bez zamaczania brzegu kolumny.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Zalecamy stosowanie końcówek do pipet z barierą aerozolową.
- W krokach płukania próbek zawsze używać nowych probówek do płukania.
- Przed rozpoczęciem mieszania i wirowania upewnić się, że zatyczki probówek są dokładnie zamknięte.
- Przed rozpoczęciem wirowania upewnić się, że kolumna QIAamp MinElute jest dokładnie zamknięta.
- Po wszystkich etapach mieszania pulsacyjnego i inkubacji w temperaturze 90°C odwirować krótko próbki do mikrowirówki, aby usunąć krople z wnętrza wieczka.
- Otwierać jednorazowo tylko jedną kolumnę QIAamp MinElute i zachować ostrożność, aby unikać wytwarzania aerozoli.
- Zawsze zmieniać skalpel między próbkami.
- Należy zawsze zmieniać końcówki pipet pomiędzy przenoszeniami płynów. Zalecamy, aby w celu zminimalizowania zanieczyszczenia krzyżowego, używać końcówek pipet z barierą aerozolową i unikać używania pipet do wielokrotnego dozowania („multistep”).
- Należy zawsze używać rękawiczek jednorazowych i regularnie sprawdzać, czy nie są zanieczyszczone materiałem próbki. Wyrzucić rękawiczki, jeśli podejrzewa się, że są zanieczyszczone.
- Otwierać po jednej probówce naraz.

Odwirowanie

Kolumny QIAamp MinElute pasują do większości standardowych probówek do mikrowirówek o pojemności 1,5–2 ml. Osobno dostępne są probówki do płukania o pojemności 2 ml (QIAGEN, nr kat. 19201). Odwirowanie kolumn QIAamp MinElute przeprowadza się przy około 6000 x g w celu redukcji szumu wirówki. Odwirowanie z maksymalną prędkością nie zwiększy uzysku DNA. Jednak odwirowanie kolumn QIAamp MinElute z maksymalną prędkością jest wymagane w dwóch krokach procedury: w kroku odwirowywania na sucho po płukaniu membran i w kroku wymywania. Odwirowanie z maksymalną prędkością jest także wymagane w celu ściągnięcia próbki po rozpuszczeniu parafiny ksylenem i płukaniu etanolem.

Wszystkie etapy odwirowywania należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej (15–25°C). Niska temperatura podczas odwirowywania może prowadzić do nieoptymalnej ekstrakcji.

Przetwarzanie kolumn QIAamp MinElute w mikrowirówce

- Przed umieszczeniem kolumny QIAamp MinElute w mikrowirówce należy ją koniecznie zamknąć.
- Unikać dotykania membrany kolumny QIAamp MinElute końcówką pipety.
- Należy zwrócić uwagę, że frakcje przesączu mogą zawierać niebezpieczne odpady i należy je odpowiednio usunąć.
- W celu wydajnego jednoczesnego przetwarzania wielu próbek zalecamy wypełnienie statywu probówkami do płukania, do których będzie można przenosić kolumny QIAamp MinElute po odwirowaniu. Zużyte probówki do płukania zawierające przesącz można wyrzucić, a nowe probówki do płukania zawierające kolumny QIAamp MinElute można umieścić bezpośrednio w mikrowirówce.
- Należy zapewnić możliwość prześledzenia pochodzenia każdej próbki w trakcie całego procesu.

Wymywanie oczyszczonego DNA

W przypadku dalszych testów, w których wymagane są niewielkie objętości początkowe (np. niektórych testów PCR) większe stężenie eluatu może zwiększać czułość testu, ale jednocześnie wiązać się ze zwiększonym stężeniem potencjalnych inhibitorów.

Zwiększenie objętości wymywania zmniejszy stężenie DNA w eluacie.

Objętość uzyskanego eluatu może być o około 5 μl mniejsza od objętości buforu ATE dodanego do kolumny QIAamp MinElute. Na przykład przy objętości wymywania 20 μl objętość eluatu będzie ≥ 15 μl . Objętość uzyskanego eluatu jest zależna od właściwości próbki.

Użytkownik jest odpowiedzialny za zoptymalizowanie objętości wymywania pod kątem procedur stosowanych w swoim laboratorium. Zalecane objętości wymywania właściwe dla dalszych zastosowań konkretnych produktów QIAGEN opisano w instrukcjach obsługi odpowiednich zestawów.

Uzyski można zwiększyć poprzez inkubację kolumny z buforem ATE w temperaturze pokojowej, na przykład przez 5 minut przed odwirowaniem. Wymyte DNA można zbierać do próbek do wymywania o pojemności 1,5 ml (dostarczonych w zestawie). Warunki przechowywania wymytego DNA zależą od wymagań zdefiniowanych przez użytkownika. Zalecane warunki przechowywania właściwe dla dalszych zastosowań konkretnych produktów QIAGEN opisano w instrukcjach obsługi odpowiednich zestawów.

Protokół: izolacja genomowego DNA ze skrawków tkankowych FFPE

Procedura

1. Za pomocą skalpela odciąć nadmiar parafiny od bloku z próbką.
2. Pociąć na skrawki zgodnie ze standardową praktyką laboratoryjną (patrz „Materiał wyjściowy”, strona 15). Użytkownik powinien zoptymalizować liczbę, grubość i pole powierzchni skrawków z uwzględnieniem procedur realizowanych w swoim laboratorium. Zapewnić możliwość prześledzenia pochodzenia każdej próbki w trakcie całej procedury.
3. Od razu zeszkrobywać tkankę ze skrawków do próbki do lizy (dostarczonej w zestawie), używając jałowego skalpela. Dopilnować, aby cała dostępna tkanka została umieszczona w próbce. Dodać do próbki 1 ml ksylenu, zamknąć pokrywkę i energicznie mieszać, dopóki parafina się nie rozpuści (np. przez 10 s). Dopilnować, aby próbka była całkowicie zamknięta, aby uniknąć rozlania ksylenu, zanieczyszczenia krzyżowego między próbkami i kontaktu z ksylenem.

Uwaga: Ksylenu używać pod wyciągiem lub w innym urządzeniu niedopuszczającym do rozprzestrzeniania się oparów.

4. Wirować z maksymalną prędkością przez około 2 minuty w temperaturze pokojowej, aby zebrać osad tkankowy. Jeśli nie powstał osad tkankowy, powtórzyć ten krok.

Uwaga: Niska temperatura podczas odwirowywania może prowadzić do nieoptymalnej ekstrakcji.

5. Odpipetować i zutylizować supernatant. Zachować osad.

Supernatant zawiera ksylen, który jest odpadem niebezpiecznym, i powinien być odpowiednio utylizowany zgodnie z lokalnymi przepisami.

6. Dodać 1 ml etanolu (96–100%) do osadu tkankowego i dokładnie wymieszać przez worteksowanie.

Etanol wyodrębni pozostałości ksylenu z próbki; należy go prawidłowo zutylizować.

7. Wirować z maksymalną prędkością przez około 2 minuty w temperaturze pokojowej.

Odpipetować supernatant. Nie usuwać osadu tkankowego.

Ostrożnie usunąć ewentualne pozostałości etanolu, używając cienkiej końcówki pipety.

Otworzyć probówkę i inkubować w temperaturze 15–40°C, dopóki nie odparują wszelkie pozostałości etanolu. Usunięcie pozostałości etanolu ma kluczowe znaczenie dla powodzenia ekstrakcji.

Uwaga: Niższa temperatura inkubacji spowalnia parowanie, natomiast wyższa temperatura może spowodować przesuszenie osadu tkankowego i utrudnić uzyskanie zawiesiny.

8. Odtworzyć zawiesinę z osadu w 180 µl buforu ATL. Dodać 20 µl proteinazy K i wymieszać poprzez worteksowanie.

Uwaga: Warunkiem maksymalnego uzysku jest dokładne odtworzenie zawiesiny osadu tkankowego w buforze ATL.

9. Inkubować w temperaturze 56°C ± 3°C przez około 1 godzinę (aż próbka całkowicie ulegnie lizie).

10. Inkubować w temperaturze 90°C ± 5°C przez 1 godzinę ± 5 min.

Inkubacja w buforze ATL przy temperaturze 90°C częściowo odwraca modyfikację kwasów nukleinowych spowodowaną przez formaldehyd. Krótszy czas lub niższa temperatura inkubacji może niekorzystnie wpłynąć na jakość i ilość DNA. Jeśli używany jest tylko jeden blok grzewczy, pozostawić próbkę w temperaturze pokojowej po zakończeniu inkubacji w 56°C, dopóki blok grzewczy nie osiągnie temperatury 90°C.

11. Odwirować krótko probówkę w celu usunięcia kropli z wnętrza wieczka.

12. Dodać 200 µl buforu AL do próbki i dokładnie wymieszać poprzez worteksowanie.

Następnie dodać 200 µl etanolu (96–100%) i ponownie dokładnie wymieszać poprzez worteksowanie.

Bardzo ważne jest niezwłoczne i dokładne wymieszanie próbki, buforu AL i etanolu poprzez worteksowanie lub pipetowanie w celu uzyskania jednorodnego roztworu.

Bufor AL i etanol można wstępnie wymieszać i dodać razem w jednym kroku, aby zaoszczędzić czas podczas obróbki wielu próbek. Po dodaniu buforu AL i etanolu

może wytrącić się biały osad. Osad ten nie zakłóca procedury QIAamp. Zawsze należy używać świeżej mieszaniny i zaraz po użyciu ją utylizować.

13. Odwirować krótko probówkę w celu usunięcia kropli z wnętrza wieczka.
14. Ostrożnie przenieść cały lizat do kolumny QIAamp MinElute (w probówce do płukania o pojemności 2 ml), nie zwilżając brzegu, zamknąć wieczko i odwirowywać z prędkością około 6000 x g przez ≥ 1 minutę. Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w czystej probówce do płukania o pojemności 2 ml (dostarczonej w zestawie) i wyrzucić probówkę do płukania zawierającą przesącz.

Jeśli lizat nie przeszedł całkowicie przez kolumnę po odwirowaniu, należy ponownie odwirować przy większej prędkości aż kolumna QIAamp MinElute będzie pusta.

15. Ostrożnie otworzyć kolumnę QIAamp MinElute i dodać 500 μ l zrekonstruowanego buforu AW1 bez zwilżania brzegu. Zamknąć wieczko i odwirowywać przy prędkości około 6000 x g przez ≥ 1 minutę. Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w czystej probówce do płukania o objętości 2 ml i zutylizować probówkę zawierającą przesącz.
16. Ostrożnie otworzyć kolumnę QIAamp MinElute i dodać 500 μ l zrekonstruowanego buforu AW2 bez zwilżania brzegu. Zamknąć wieczko i odwirowywać przy prędkości około 6000 x g przez ≥ 1 minutę. Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w czystej probówce do płukania o objętości 2 ml i zutylizować probówkę zawierającą przesącz. Należy unikać zetknięcia kolumny QIAamp MinElute z przesączem. Koniecznie zadbać o wyrównowanie wirnika wirówki. Niektóre wirniki wirówek mogą drgać po zmniejszeniu prędkości obrotowej, wskutek czego przesącz zawierający etanol może zetknąć się z kolumną QIAamp MinElute. Wyjmując kolumnę QIAamp MinElute i probówkę do płukania z wirnika należy uważać, aby przesącz nie zetknął się z kolumną.
17. Odwirowywać przy maksymalnej prędkości (około 20 000 x g) przez 3 minuty w celu całkowitego osuszenia membrany.

Przeniesienie etanolu do eluatu może zakłócić działanie niektórych dalszych testów.

18. Umieścić kolumnę QIAamp MinElute w czystej probówce do płukania o pojemności 1,5 ml (dostarczonej w zestawie) i wyrzucić probówkę do płukania zawierającą przesącz. Ostrożnie otworzyć wieczko kolumny QIAamp MinElute i nanieść 20–200 μ l buforu ATE na środek membrany.

WAŻNE: Jeśli objętość wymywania jest niewielka (<50 μ l), nanieść bufor ATE na środek membrany, aby zapewnić całkowite wymycie związanego DNA. Kolumny QIAamp MinElute umożliwiają swobodny wybór objętości wymywania. Należy wybrać objętość odpowiednią do dalszego zastosowania. Objętość eluatu będzie o około 5 μ l mniejsza od objętości roztworu do wymywania dodanego do kolumny.

19. Zamknąć wieczko i inkubować w temperaturze pokojowej (15–25°C) przez co najmniej 1 minutę. Odwirowywać przy maksymalnej prędkości (około 20 000 x g) przez \geq 1 minutę. Inkubacja kolumny QIAamp MinElute z buforem ATE przez około 5 minut w temperaturze pokojowej przed odwirowaniem może zwiększyć uzysk DNA.

Kontrola jakości

Zgodnie z poświadczonym certyfikatem ISO systemem zarządzania jakością firmy QIAGEN każda seria zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue jest testowana ze wstępnie ustalonymi specyfikacjami w celu zapewnienia spójnej jakości produktu.

Ograniczenia

Charakterystykę działania zestawu stosowanego do izolacji genomowego DNA określono przy użyciu tkanek utrwalanych w formalinie i zatopionych w parafinie (tkanek FFPE).

Użytkownik jest odpowiedzialny za walidację wydajności systemu do wszelkich procedur stosowanych w danym laboratorium, które nie są objęte badaniami wydajności wykonanymi przez firmę QIAGEN i opisanymi w instrukcji obsługi.

W celu zminimalizowania ryzyka negatywnego wpływu na wyniki diagnostyczne należy stosować odpowiednie kontrole do dalszych zastosowań. W celu dalszej walidacji zalecane są wytyczne Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji Wymagań Technicznych (ICH) w ICH Q2(R1) Walidacja Procedur Analitycznych: Tekst i metodologia.

Wszelkie uzyskane wyniki diagnostyczne należy interpretować wraz z innymi wynikami badań klinicznych i laboratoryjnych.











Jeśli próbka zawiera także RNA, to oczyszczanie przy użyciu zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue może doprowadzić do wyodrębnienia RNA razem z DNA.

Charakterystyka działania zestawu

Informacje o charakterystyce działania zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue można znaleźć na stronie www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.

Symbole

Na opakowaniu i w dokumentacji mogą znajdować się następujące symbole:

Symbol	Definicja symbolu
 Σ <N>	Zawiera odczynniki wystarczające do przeprowadzenia <N> reakcji
	Termin ważności
	Wyrób medyczny do diagnostyki in vitro
	Po otrzymaniu
	Numer katalogowy
	Numer partii
	Numer materiału
	Elementy składowe
	Zawiera
	Numer

Symbol**Definicja symbolu**

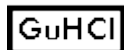
Po dodaniu etanolu do butelki zapisać bieżącą datę



Etanol



Dodawanie



Chlorowodorek guanidyny



Kwas maleinowy



Globalny numer pozycji handlowej



Przestrzegać zakresu temperatury



Producent



Należy zapoznać się z instrukcją użytkownika



Przeostroga

Informacje kontaktowe

W celu uzyskania pomocy technicznej lub szczegółowych informacji należy odwiedzić nasze Centrum Pomocy Technicznej na stronie www.qiagen.com/Support, zadzwonić pod numer 00800-22-44-6000 lub skontaktować się telefonicznie z jednym z działów pomocy technicznej firmy QIAGEN lub z lokalnymi dystrybutorami (patrz tylna okładka lub strona www.qiagen.com).

Dane do zamówień

Produkt	Zawartość	Nr kat.
Zestaw QIAamp DSP DNA FFPE Tissue — do oczyszczania genomowego DNA z tkanek zatopionych w parafinie		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Do 50 badań DNA: kolumny 50 QIAamp MinElute®, proteinaza K, bufory, probówki do płukania (2 ml), probówki do wymywania (1,5 ml), probówki do lizy (2 ml)	60404

Aktualne informacje na temat licencji i zastrzeżeń dotyczących konkretnych produktów można uzyskać z instrukcji obsługi odpowiedniego zestawu QIAGEN lub z podręcznika użytkownika. Instrukcje obsługi lub podręczniki użytkownika zestawu QIAGEN są dostępne w witrynie www.qiagen.com. Można je także zamówić w serwisie lub u lokalnego dystrybutora firmy QIAGEN.

Znaki towarowe: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (grupa QIAGEN); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Ograniczona umowa licencyjna dla zestawu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

Korzystanie z tego produktu oznacza zgodę nabywcy lub użytkownika produktu na następujące warunki:

1. Ten produkt może być stosowany wyłącznie zgodnie z wytycznymi dołączonymi do produktu oraz niniejszą instrukcją i wyłącznie z elementami znajdującymi się w tym panelu. Firma QIAGEN nie udziela żadnej licencji w zakresie praw własności intelektualnej do użytkowania niniejszego zestawu z elementami nienależącymi do panelu z wyjątkiem elementów opisanych w wytycznych dołączonych do produktu, niniejszej instrukcji oraz dodatkowych wytycznych dostępnych na stronie www.qiagen.com. Niektóre dodatkowe wytyczne zostały sformułowane przez użytkowników usług QIAGEN z myślą o innych użytkownikach usług QIAGEN. Te wytyczne nie zostały dokładnie przetestowane ani poddane procesowi optymalizacji przez firmę QIAGEN. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że nie naruszają one praw innych podmiotów.
2. Firma QIAGEN nie gwarantuje, że niniejszy panel i/lub jego użytkowanie nie narusza praw osób trzecich. Wyjątek stanowią jedynie wyraźnie określone licencje.
3. Panel oraz jego elementy są przeznaczone do jednorazowego użytku. Nie są przeznaczone do ponownego użycia, regeneracji ani odsprzedaży.
4. Poza wyraźnie określonymi licencjami firma QIAGEN nie udziela innych licencji wyraźnych ani dorozumianych.
5. Nabywca i użytkownik panelu zobowiązuje się nie podejmować działań ani nie zezwalać innym osobom na podejmowanie działań mogących doprowadzić do opisanych wyżej czynności zabronionych lub ich umożliwienia. Firma QIAGEN może wnosić roszczenia wynikające z niniejszej Umowy ograniczonej licencji do dowolnego sądu i będzie rościć prawa do zwrotu wszelkich kosztów postępowań i kosztów sądowych, w tym wynagrodzeń prawników, związanych z egzekwowaniem postanowień Umowy ograniczonej licencji lub praw własności intelektualnej w zakresie panelu i/lub jego elementów.

Aktualne warunki licencyjne dostępne są w witrynie www.qiagen.com.

Luty 2017 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, wszelkie prawa zastrzeżone.

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