

Agosto 2015

Scheda del protocollo QIASymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP e

Tissue_HC_200_V7_DSP

Questo documento è la scheda del protocollo *Tissue_LC_200_V7_DSP* e *Tissue_HC_200_V7_DSP* QIASymphony SP, R2, per il kit versione 1.

Informazioni generali

Per uso diagnostico in vitro.

Questi protocolli sono studiati per la purificazione del DNA totale da tessuti e tessuti FFPE, ossia fissati in formalina e inclusi in paraffina, utilizzando il QIASymphony® SP e il kit QIASymphony DSP DNA Mini.

Si consiglia di utilizzare il protocollo a basso contenuto (LC) o ad alto contenuto (HC) a seconda del tipo di campione. I tessuti producono maggiori rese di DNA se processati con il protocollo ad alto contenuto, ma se è necessaria un'elevata concentrazione di DNA, è possibile utilizzare il protocollo a basso contenuto in combinazione con un ridotto volume di eluizione (50 µl). Per il tessuto FFPE si consiglia di utilizzare il protocollo a basso contenuto.

Protocollo a basso contenuto

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat. n. 937236)
Campioni	Tessuto FFPE e tessuto* In una preparazione possono essere combinate fino a 4 sezioni di tessuto FFPE, ciascuna con spessore fino a 10 µm, oppure 8 sezioni con spessore fino a 5 µm e superficie fino a 250 mm ² .
Nome del protocollo	Tissue_LC_200_V7_DSP
Set di controllo del test predefinito	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volume di eluizione	50 µl, 100 µl, 200 µl o 400 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0

* Vedere il protocollo ad alto contenuto per informazioni sui campioni di tessuto

Protocollo ad alto contenuto

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat. n. 937236)
Campioni	Tessuto In mancanza di informazioni sulla resa prevista, consigliamo di iniziare con un campione di 25 mg. A seconda della resa ottenuta è possibile aumentare le dimensioni del campione nelle successive preparazioni.
Nome del protocollo	Tissue_HC_200_V7_DSP
Set di controllo del test predefinito	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volume di eluizione	100 µl, 200 µl o 400 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0

Materiale necessario ma non in dotazione

Per tutti i tipi di campioni

- Tampone ATL, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, cat. n. 939016)
- Per ridurre al minimo il contenuto di RNA: RNasi A priva di DNasi (soluzione madre di 100 mg/ml)

Per il tessuto FFPE (deparaffinazione senza xilene)

- Soluzione di deparaffinazione (Deparaffinization Solution, cat. n. 939018)

Per il tessuto FFPE (deparaffinazione con xilene)

- Xilene (99–100%)
- Etanolo (96–100%)*

Cassetto "Sample" (Campione)

Tipo di campione	Tessuto FFPE e tessuto
Volume d'ingresso del campione	220 µl (necessario per campione, per protocollo)*
Volume di campione processato	200 µl
Provette per campioni primarie	n/a
Provette per campioni secondarie	Per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Inserti	Dipendono dal tipo di provetta per campioni utilizzata; per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* Il sistema non riconosce né per il protocollo ad alto contenuto né per il protocollo a basso contenuto se il volume del campione è inferiore a 220 µl perché il trasferimento del campione viene effettuato senza rilevamento del livello del liquido. Occorre pertanto accertarsi che il volume d'ingresso del campione sia 220 µl.

n/a = non applicabile

* Non usare alcool denaturato, in quanto contiene altre sostanze quali metanolo o metiletilchetone.

Cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo)

Posizione A1 e/o A2	Cartuccia reagenti
Posizione B1	n/a
Supporto rack per puntali 1-17	Puntali con filtro monouso, 200 µl o 1500 µl
Supporto per box unitari 1-4	Box unitari contenenti cartucce per la preparazione dei campioni o coperchi per 8 barre

n/a = non applicabile

Cassetto "Waste" (Materiali di scarto)

Supporto per box unitari 1-4	Box unitari vuoti
Supporto per sacchetto dei materiali di scarto	Sacchetto dei materiali di scarto
Supporto per contenitore dei residui liquidi	Contenitore dei residui liquidi vuoto

Cassetto "Eluate" (Eluito)

Rack per eluizione (consigliamo di utilizzare l'apertura 1, posizione di raffreddamento)	Per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
---	---

Plastica da laboratorio occorrente

	Un lotto, 24 campioni*	Due lotti, 48 campioni*	Tre lotti, 72 campioni*	Un lotto, 24 campioni*
Puntali con filtro monouso, 200 µl†	26	50	74	98
Puntali con filtro monouso, 1500 µl†	72	136	200	264
Cartucce per la preparazione dei campioni§	21	42	63	84
Coperchi per 8 barre¶	3	6	9	12

* L'impiego di meno di 24 campioni per lotto riduce il numero di puntali con filtro monouso necessari per ogni processazione.

† Ci sono 32 puntali con filtro in ogni rack corrispondente.

‡ La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

§ Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

¶ Ci sono dodici coperchi per 8 barre in ogni box unitario

Nota: Le quantità indicate per i puntali con filtro possono variare da quelle visualizzate sul touch screen a seconda delle impostazioni. Si consiglia di caricare la massima quantità possibile di puntali.

Volume di eluizione

Il volume di eluizione viene selezionato sul touch screen. In base al tipo di campione e al contenuto di DNA, il volume di eluito finale può variare di ben 15 µl in meno rispetto al volume selezionato. Data la possibile variazione del volume di eluito, si consiglia di controllare l'effettivo volume di eluito quando si utilizza un sistema automatizzato di setup del test che non verifica il volume di eluito prima del trasferimento. L'eluizione in volumi inferiori aumenta la concentrazione finale di DNA, ma riduce leggermente la resa. Si consiglia di utilizzare un volume di eluizione adeguato alla prevista applicazione a valle.

Preparazione dei campioni

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Punto importante prima di iniziare

- Le particelle magnetiche del QIAasymphony eseguono la procedura di purificazione sia sull'RNA che sul DNA se entrambi sono presenti nel campione. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere RNasi A al campione nella fase indicata nel rispettivo protocollo di pretrattamento.

Prima di iniziare

- Controllare se il tampone ATL presenta del precipitato bianco. Se necessario, incubare per 30 minuti a 37°C agitando di tanto in tanto per sciogliere il precipitato.
- Impostare un thermomixer o un agitatore/incubatore alla temperatura necessaria per il rispettivo pretrattamento..*

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati periodicamente secondo le disposizioni del produttore.

Tessuti

Per la purificazione del DNA possono essere utilizzati tessuti freschi o congelati. La resa e la qualità del DNA ottenuto dipenderanno dal tipo di tessuto, dalla fonte e dalle condizioni di conservazione. Il tessuto fresco può essere tagliato in piccoli pezzi e conservato a -20°C o -80°C prima della processazione. In linea generale, si consiglia di utilizzare il protocollo ad alto contenuto, in quanto consente di ottenere maggiori rese di DNA. Il protocollo a basso contenuto in combinazione con il volume di eluizione di 50 μl è consigliato unicamente se sono necessarie elevate concentrazioni di DNA per l'analisi a valle. In mancanza di informazioni sulla resa prevista, si consiglia di iniziare con un campione di 25 mg utilizzando il protocollo ad alto contenuto e il volume di eluizione di 200 μl . A seconda della resa ottenuta, è possibile aumentare le dimensioni del campione o ridurre il volume di eluizione nelle successive preparazioni. Si noti che sovraccaricando le preparazioni in combinazione con ridotti volumi di eluizione potrebbe verificarsi un trascinarsi di particelle magnetiche nell'eluato, con conseguente compromissione della purezza del DNA e dell'analisi a valle.

Protocollo di pretrattamento per il tessuto

1. Trasferire il campione di tessuto in una provetta per microcentrifuga da 2 ml (non fornita).
2. Aggiungere 220 μl di tampone ATL.
3. Aggiungere 20 μl di proteinasi K e miscelare picchiando la provetta.

Nota: Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

4. Collocare la provetta in un ThermoMixer o agitatore-incubatore e incubare a 56°C agitando a 900 giri/min finché il tessuto non è completamente lisato.

Nota: Il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti la lisi si completa nel giro di 3 ore. Se dopo 3 ore la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile o di lisati altamente viscosi, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 6. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione..

5. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 4 μl di RNasi A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente ($15-25^{\circ}\text{C}$) prima di continuare con la fase 6.
6. Omogeneizzare il campione aspirandolo e rilasciandolo diverse volte con una pipetta.

Nota: Se sono ancora presenti pezzi di materiale insolubile, centrifugare a $3000 \times g$ per 1 minuto.

7. Trasferire con cautela 220 µl del supernatante in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIA Symphony SP.

Per un elenco completo delle provette per campioni compatibili, visitare il sito www.qiagen.com/goto/dsphanhandbooks. Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt, cat. n. 72.693 o 72.608).

Tessuto FFPE

Le procedure standard di fissazione in formalina e inclusione in paraffina comportano sempre una significativa frammentazione degli acidi nucleici. Per limitare la portata della frammentazione del DNA accertarsi di:

- fissare i campioni in formalina al 4–10% il più velocemente possibile dopo il prelievo chirurgico
- utilizzare un tempo di fissazione di 14–24 ore (tempi di fissazione più lunghi comportano una più grave frammentazione del DNA con conseguente riduzione delle prestazioni dei test a valle)
- disidratare accuratamente i campioni prima dell'inclusione in paraffina (la formalina residua può inibire la digestione della proteinasi K)

Il materiale di partenza per la purificazione del DNA deve essere formato da sezioni appena tagliate di tessuto FFPE. In una preparazione possono essere processate fino a 4 sezioni, ciascuna con spessore fino a 10 µm, oppure 8 sezioni con spessore fino a 5 µm e superficie fino a 250 mm². Se non si possiedono informazioni sulla natura del materiale di partenza, si consiglia di iniziare con non più di 3 sezioni in una sola preparazione. A seconda della resa e della purezza del DNA può essere possibile utilizzare fino a 8 sezioni nelle successive preparazioni.

Nota: I protocolli per tessuto FFPE sono studiati appositamente per eseguire esclusivamente la copurificazione di ridotte quantità di RNA. Ciò comporta un valore di misurazione fotometrico ridotto rispetto ai valori ottenuti con il kit manuale QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue.

Protocollo di pretrattamento per il tessuto FFPE

Metodo 1: Deparaffinazione con soluzione di deparaffinazione

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocco campione.
2. Tagliare fino a 4 sezioni con spessore di 10 µm oppure fino a 8 sezioni con spessore di 5 µm.

Nota: Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2–3 sezioni.

3. Collocare immediatamente le sezioni in una provetta Sarstedt da 2 ml (non fornita, cat. n. 72.693 o 72.608) che sia compatibile con il portacampioni del QIASymphony SP.
4. Aggiungere 200 µl di tampone ATL alle sezioni.
5. Aggiungere 20 µl di proteinasi K.

Nota: Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIASymphony DSP DNA Mini.

6. Aggiungere 160 µl o 320 µl di soluzione di deparaffinazione (vedere tabella sotto) e miscelare su vortex.

Spessore delle sezioni	Numero di sezioni	Volume di soluzione di deparaffinazione
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Collocare la provetta in un thermomixer o agitatore/incubatore e incubare a 56°C per 1 ora agitando a 1000 giri/min finché il tessuto non è completamente lisato.

Nota: Il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti la lisi si completa nel giro di 1 ora. Se dopo 1 ora la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 10. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.

8. Incubare a 90°C per 1 ora.

Nota: L'incubazione a 90°C in tampone ATL inverte parzialmente la modifica della formaldeide degli acidi nucleici. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA. Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.

9. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 2 µl di RNasi A (100 mg/ml) alla fase inferiore e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 10. Fare raffreddare il campione a temperatura ambiente prima di aggiungere RNasi A.
10. Centrifugare a massima velocità per 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Trasferire con cautela le provette (contenenti entrambi le fasi) nel portacampioni del QIASymphony SP

Metodo 2: Deparaffinazione con xilene

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocco campione.
2. Tagliare fino a 4 sezioni con spessore di 10 μm oppure fino a 8 sezioni con spessore di 5 μm .
Nota: Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2–3 sezioni.
3. Collocare immediatamente le sezioni in una provetta per microcentrifuga da 1,5 o 2 ml (non fornita) e aggiungere 1 ml di xilene al campione. Chiudere il coperchio e agitare vigorosamente su vortex per 10 secondi.
4. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.
5. Rimuovere il supernatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.
6. Aggiungere 1 ml di etanolo (96–100%) al pellet e miscelare su vortex.
Nota: L'etanolo estrae lo xilene residuo dal campione.
7. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.
8. Rimuovere il supernatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.
Nota: Rimuovere con cautela l'etanolo residuo con un puntale per pipetta sottile.
9. Aprire la provetta e incubare a temperatura ambiente (15–25°C) per 10 minuti o finché tutto l'etanolo residuo non è evaporato.
Nota: L'incubazione può essere effettuata a temperature fino a 37°C.
10. Risospendere il pellet in 220 μl di tampone ATL.
11. Aggiungere 20 μl di proteinasi K e miscelare su vortex.
Nota: Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIASymphony DSP DNA Mini.
12. Incubare a 56°C per 1 ora (oppure finché il campione non è completamente lisato).
Nota: Il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti la lisi si completa nel giro di 1 ora. Se dopo 1 ora la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 16. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.
13. Incubare a 90°C per 1 ora.
Nota: L'incubazione a 90°C in tampone ATL inverte parzialmente la modifica della formaldeide degli acidi nucleici. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA. Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.

14. Centrifugare brevemente il campione per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.
15. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 2 µl di RNasi A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 16. Fare raffreddare il campione a temperatura ambiente prima di aggiungere RNasi A.
16. Trasferire con cautela 220 µl del lisato in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIASymphony SP.

Nota: Se i lisati contengono materiale non digerito, centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente prima di trasferire il supernatante nelle provette per campioni. Per un elenco completo delle provette per campioni compatibili, visitare il sito www.qiagen.com/goto/dsphanhandbooks. Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt, cat. n. 72.693 o 72.608)..

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (Gruppo QIAGEN); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). I marchi, i nomi registrati ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge. 08/2015 HB-0977-S01-002 © 2012–2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

