

# QIASymphony SP protokolark

---

## Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP og Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

### Generel information

Til in vitro-diagnostisk brug.

Disse protokoller er til oprensning af totalt DNA fra væv og formalinfikseret, paraffinindlejret (FFPE) væv med anvendelse af QIASymphony® SP og QIASymphony DSP DNA Mini-kit. Protokoller for dyrkede celler og bakteriekulturer er under udvikling og vil snart være tilgængelige.

Afhængig af den samme type anbefaler vi at anvende enten protokollen for lavt indhold (LC) eller højt indhold (HC). Væv vil give øgede DNA-resultater, når behandlet med protokollen for højt indhold, men protokollen for lavt indhold sammen med en lille elueringsmængde (50 µl) kan anvendes, hvis en høj DNA-koncentration er påkrævet. For FFPE-væv anbefaler vi at anvende protokollen for lavt indhold.

### Protokol for lavt indhold

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr. 937236)
<b>Prøvemateriale</b>	FFPE-væv og væv*  Op til 4 FFPE-vævssektioner, hver med en tykkelse på op til 10 µm eller 8 sektioner med en tykkelse på op til 5 µm og et overfladeareal på op til 250 mm <sup>2</sup> , kan kombineres i én prøveklargøring.
<b>Protokolnavn</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Standard analysekontROLSÆT</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Elueringsmængde</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
<b>Påkrævet softwareversion</b>	Version 4.0

\* Se protokollen for højt indhold for information om vævsprøver.

April 2012



---

Sample & Assay Technologies

## Protokol for højt indhold

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr. 937236)
<b>Prøvemateriale</b>	Væv  Hvis ingen information om det forventede resultat er tilgængelig, anbefaler vi at starte med 25 mg prøvemateriale. Afhængig af det opnåede resultat kan prøvestørrelsen øges i efterfølgende prøveklargøringer.
<b>Protokolnavn</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Standard analysekontrolsæt</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Elueringsmængde</b>	100 µl, 200 µl eller 400 µl
<b>Påkrævet softwareversion</b>	Version 4.0

## Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

### Til alle prøvetyper

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (katalognr. 939016)
- Hvis RNA-frit DNA er påkrævet: DNase-fri RNase A (stamopløsning på 100 mg/ml)

### Til FFPE-væv (xylenfri afparaffinering)

- Afparaffineringsopløsning (Deparaffinization Solution, katalognr. 939018)

### Til FFPE-væv (afparaffinering vha. xylen)

- Xylen (99–100 %)
- Ethanol (96–100 %)\*

\* Der må ikke anvendes denatureret alkohol, som indeholder yderligere stoffer, såsom methanol eller methylethylketon.

## Skuffen "Sample" (Prøve)

<b>Prøvetype</b>	FFPE-væv og væv
<b>Prøveinputmængde</b>	220 $\mu$ l (påkrævet pr. prøve, pr. protokol)*
<b>Behandlet prøvemængde</b>	200 $\mu$ l
<b>Primære prøveglas</b>	i/r
<b>Sekundære prøveglas</b>	Se <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> for at få flere oplysninger.
<b>Indsatser</b>	Afhænger af den anvendte prøveglastype, for at få flere oplysninger se <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

\* Eftersom prøveoverførslen af protokoller med højt og lavt indhold udføres uden væskeneveaudetektion, vil systemet ikke genkende, om prøvemængden er mindre end 220  $\mu$ l. Derfor skal det sikres, at prøveinputmængden er 220  $\mu$ l.

i/r = ikke relevant.

## Skuffen "Reagents and Cosumables" (Reagenser og forbrugsartikler)

<b>Position A1 og/eller A2</b>	Reagenspatron
<b>Position B1</b>	i/r
<b>Spidsrackholder 1-17</b>	Engangsfilterspidser, 200 $\mu$ l eller 1500 $\mu$ l
<b>Enhedsboksholder 1-4</b>	Enhedsbokse med prøveklargøringsbeholdere eller 8-stavs dæksler

i/r = ikke relevant.

## Skuffen "Waste" (Affald)

<b>Enhedsboksholder 1-4</b>	Tomme enhedsbokse
<b>Affaldsposeholder</b>	Affaldspose
<b>Holder til flaske til flydende affald</b>	Tom flaske til flydende affald

## Skuffen "Eluate" (Eluat)

Elueringsrack (vi anbefaler at anvende åbning 1, afkølingsposition) Se [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks) for at få flere oplysninger.

## Påkrævede plastikprodukter

	Et batch, 24 prøver*	To batches, 48 prøver*	Tre batches, 72 prøver*	Fire batches, 96 prøver*
Engangs filterspidser, 200 µl <sup>††</sup>	26	50	74	98
Engangs filterspidser, 1500 µl <sup>††</sup>	72	136	200	264
Prøveklargøringsbeholdere <sup>§</sup>	21	42	63	84
8-stavs dæksler <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Anvendelse af mindre end 24 prøver pr. batch reducerer antallet af engangsfilterspidser påkrævet pr. kørsel.

† Der er 32 filterspidser/spidsrack.

† Antal nødvendige filterspidser indeholder filterspidser til 1 indholdsscanning per reagensbeholder.

§ Der er 28 prøveklargøringsbeholdere/enhedsboks.

¶ Der er tolv 8-stavs dæksler/enhedsboks.

**Bemærk:** Antallet af angivne filterspidser kan afvige fra det antal, der vises på berøringskærmen, afhængigt af indstillinger. Vi anbefaler at isætte det størst mulige antal spidser.

## Elueringsmængde

Elueringsmængden vælges på berøringskærmen. Afhængig af prøvetypen og DNA-indholdet kan den endelige eluatmængde variere med op til 15 µl mindre end den valgte mængde. Da eluatmængden kan variere anbefaler vi at tjekke den faktiske eluatmængde, når der anvendes et automatiseret analyseopsætningssystem, som ikke verificerer eluatmængden før overførslen. Eluering i lavere mængder øger den endelige DNA-koncentration, men reducerer udbyttet en smule. Vi anbefaler at anvende en elueringsmængde, der er passende for den tilsigtede senere anvendelse.

## Klargøring af prøvemateriale

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (material safety data sheets, MSDSs), som kan fås hos den pågældende leverandør.

### Vigtigt punkt før start

- QIASymphony magnetiske partikler oprenser både RNA og DNA, hvis begge er til stede i prøven. Hvis RNA-frit DNA er påkrævet, tilsættes RNase A til prøven i trinnet angivet i den respektive forbehandlingsprotokol.

### Ting, der skal gøres før start

- Undersøg Buffer ATL for hvidt bundfald. Om nødvendigt inkuberes i 30 minutter ved 37 °C med lejlighedsvis rystning for at opløse bundfaldet.
- Indstil en termomixer eller rysteinkubator til den påkrævede temperatur til den respektive forbehandling.

### Væv

Frisk og frossent væv kan anvendes til DNA-oprensning. Opnået udbytte og DNA-kvalitet vil afhænge af vævstype, kilde og opbevaringsforhold. Frisk væv kan skæres i små stykker og opbevares ved -20 °C eller -80 °C før behandling. Generelt anbefaler vi at anvende protokollen med højt indhold, som vil give øget DNA-udbytte. Protokollen med lavt indhold, sammen med 50 µl elueringsmængde, anbefales kun, hvis høje DNA-koncentrationer er nødvendige for efterfølgende analyse. Hvis ingen information om det forventede udbytte er tilgængelig, anbefaler vi at starte med 25 mg prøvemateriale vha. protokollen med højt indhold og 200 µl elueringsmængde. Afhængig af det opnåede resultat kan prøvestørrelsen øges eller elueringsmængde reduceres i efterfølgende prøveklargøringer. Vær opmærksom på, at overfyldning af præparater sammen med små elueringsmængder kan forårsage overførsel af magnetiske partikler i eluatet og kan kompromittere DNA'ets renhed og efterfølgende analyse.

### Forbehandlingsprotokol til væv

1. **Overfør vævsprøven til et 2 ml mikrocentrifugeglas (ikke leveret).**
2. **Tilsæt 220 µl Buffer ATL.**
3. **Tilsæt 20 µl proteinase K og bland ved at banke let på glasset.**

**Bemærk:** Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini-kittet.

- Anbring glasset i en termomixer eller rysteinkubator og inkubér ved 56 °C med rystning ved 900 o/min (indtil vævet er helt lyseret).**

**Bemærk:** Lyseringstiden varierer afhængig af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 3 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 3 timer som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale eller meget viskøse lysater, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 6. Lysering i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

- Hvis RNA-frit genomisk DNA er påkrævet, tilsættes 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur (15–25 °C), før der fortsættes med trin 6.**
- Homogenisér prøven ved at pipettere op og ned flere gange.**

**Bemærk:** Hvis stykker af uopløseligt materiale stadig er til stede, centrifugeres ved 3000 x g i 1 minut.

- Overfør forsigtigt 220 µl supernatant til prøveglas, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.**

For at få en oversigt over kompatible prøveglas, se [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Vi anbefaler at anvende 2 ml glas (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.693 eller 72.608).

## FFPE-væv

Standard formalinfixerings- og paraffinindlejringsprocedurer resulterer altid i signifikant fragmentering af nukleinsyrer. For at begrænse omfanget af DNA-fragmentering skal der sørges for følgende:

- Fiksér vævsprøver i 4–10 % formalin så hurtigt som muligt efter kirurgisk fjernelse
- Anvend en fikseringstid på 14–24 timer (længere fikseringstider fører til mere alvorlig DNA-fragmentering, hvilket resulterer i ringe præstation i efterfølgende analyser)
- Dehydrér grundigt prøverne før indlejring (restformalin kan hæmme opløsningen af proteinase K).

Startmaterialet til DNA-oprensning skal være friske, afskårne sektioner af FFPE-væv. Op til 4 sektioner, hver med en tykkelse på op til 10 µm eller 8 sektioner med en tykkelse på op til 5 µm og et overfladeareal på op til 250 mm<sup>2</sup>, kan behandles i én prøveklargøring. Hvis du ikke har information om dit startmateriales beskaffenhed, anbefaler vi, at du starter med højst 3 sektioner til en enkelt prøveklargøring. Afhængig af DNA-udbyttet og dets renhed, kan det være muligt at anvende op til 8 sektioner i efterfølgende klargøringer.

## Forbehandlingsprotokol til FFPE-væv

### Afparaffinering vha. afparaffineringsopløsning

- Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken.**
- Skær op til 4 sektioner 10 µm tykt eller op til 8 sektioner 5 µm tykt.**

**Bemærk:** Hvis prøveoverfladen er blevet udsat for luft, bortskaffes de første 2–3 sektioner.

3. Anbring straks sektionerne i et 2 ml Sarstedt-glas (ikke leveret, katalognr. 72.693 eller 72.608), der er kompatibelt med QIASymphony SP's prøveholder.
4. Tilsæt 200  $\mu$ l Buffer ATL til sektionerne.
5. Tilsæt 20  $\mu$ l proteinase K.  
**Bemærk:** Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini-kittet.
6. Tilsæt 160  $\mu$ l eller 320  $\mu$ l afparaffineringsopløsning (se nedenstående tabel) og bland vha. vortexer.

Sektionernes tykkelse	Antal sektioner	Mængde afparaffineringsopløsning
5 $\mu$ m	1–4	160 $\mu$ l
	5–8	320 $\mu$ l
10 $\mu$ m	1–2	160 $\mu$ l
	3–4	320 $\mu$ l

7. Anbring glasset i en termomixer eller rysteinkubator og inkubér ved 56 °C i 1 time med rystning ved 1000 o/min (eller indtil vævet er helt lyseret).

**Bemærk:** Lyseringstiden varierer afhængig af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 1 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 1 time som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale pelleteres ved centrifugering som beskrevet i trin 10. Lysering i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

8. Inkubér ved 90 °C i 1 time.

**Bemærk:** Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvist formaldehydmodifikationen af nukleinsyrer. Længere inkuberingstider eller højere inkuberingstemperaturer kan resultere i mere fragmenteret DNA. Hvis der kun anvendes en varmeblok, skal prøven forblive ved stuetemperatur efter 56 °C inkubering, indtil varmeblokken har nået 90 °C.

9. Hvis RNA-frit genomisk DNA er påkrævet, tilsættes 2  $\mu$ l RNase A (100 mg/ml) til den lavere fase, og der inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur, før der fortsættes med trin 10. Lad prøven afkøle til stuetemperatur før der tilsættes RNase A.
10. Centrifuger ved fuld hastighed i 1 minut ved stuetemperatur.
11. Overfør forsigtigt glassene (med begge faser) til prøveholderen på QIASymphony SP.

## Afparaffinering vha. xylene

1. Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken.
2. Skær op til 4 sektioner 10  $\mu$ m tykt eller op til 8 sektioner 5  $\mu$ m tykt.

**Bemærk:** Hvis prøveoverfladen er blevet udsat for luft, bortskaffes de første 2–3 sektioner.

3. **Anbring straks sektionerne i et 1,5 eller 2 ml mikrocentrifugeglas (ikke leveret) og der tilsættes 1 ml xylen til prøven. Luk låget og vortex kraftigt i 10 sekunder.**
4. **Centrifuger ved fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur.**
5. **Fjern supernatanten ved pipettering. Pelletering må ikke fjernes.**
6. **Tilsæt 1 ml ethanol (96–100 %) til pellet'en og bland med vortexer.**  
**Bemærk:** Ethanolet ekstraherer restxylen fra prøven.
7. **Centrifuger ved fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur.**
8. **Fjern supernatanten ved pipettering. Pelletering må ikke fjernes.**  
**Bemærk:** Fjern forsigtigt eventuelt restethanol vha. en fin pipettespids.
9. **Åbn glasset og inkubér ved stuetemperatur (15–25 °C) i 10 minutter eller indtil al det resterende ethanol er fordampet.**  
**Bemærk:** Inkubation kan udføres ved temperaturer på op til 37 °C.
10. **Resuspendér pellet'en i 220 µl Buffer ATL.**
11. **Tilsæt 20 µl proteinase K og bland med vortexer.**  
**Bemærk:** Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini-kittet.
12. **Inkubér ved 56 °C i 1 time (eller indtil prøven er blevet fuldstændig lyseret).**  
**Bemærk:** Lyseringstiden varierer afhængig af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 1 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 1 time som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 16. Lysering i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.
13. **Inkubér ved 90 °C i 1 time.**  
**Bemærk:** Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvist formaldehydmodifikationen af nukleinsyrer. Længere inkuberingstider eller højere inkuberingstemperaturer kan resultere i mere fragmenteret DNA. Hvis der kun anvendes en varmeblok, skal prøven forblive ved stuetemperatur efter 56 °C inkubering, indtil varmeblokken har nået 90 °C.
14. **Centrifuger prøven kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.**
15. **Hvis RNA-frit genomisk DNA er påkrævet, tilsættes 2 µl RNase A (100 mg/ml), og der inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur, før der fortsættes med trin 16. Lad prøven afkøle til stuetemperatur før der tilsættes RNase A.**
16. **Overfør forsigtigt 220 µl af lysatet til prøveglas, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.**  
**Bemærk:** Hvis lysater indeholder uopløst materiale, centrifugeres de for fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur før supernatanten overføres til prøveglas. For at få en oversigt over kompatible prøveglas, se [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Vi anbefaler at anvende 2 ml glas (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.693 eller 72.608).



**Bemærk:** FFPE-vævsprotokoller er specielt designede til kun samtidig at oprense lave mængder RNA. Dette vil føre til en reduceret fotometrisk målingsværdi sammenlignet med værdier, der er opnået med det manuelle QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit.

## Dyrkede celler og bakterier

Forbehandlingsprotokoller til dyrkede celler, Gram-negative og Gram-positive bakterier vil snart være tilgængelige.

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN kit-håndbog eller brugervejledning. QIAGEN-håndbøger kan rekvireres fra QIAGEN Teknisk Service eller den lokale QIAGEN-forhandler. Udvalgte håndbøger kan downloades fra [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature). Sikkerhedsdatablade (MSDS) for ethvert QIAGEN-produkt kan downloades fra [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx).

Varemærker: QIAGEN®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Registrerede navne, varemærker osv. anvendt i dette dokument, selv når de ikke specifikt er markeret som sådan, skal ikke betragtes som værende juridisk ubeskyttede.

© 2012 QIAGEN. Alle rettigheder forbeholdes.

[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

**Australia** ■ 1-800-243-800

**Austria** ■ 0800/281010

**Belgium** ■ 0800-79612

**Canada** ■ 800-572-9613

**China** ■ 021-51345678

**Denmark** ■ 80-885945

**Finland** ■ 0800-914416

**France** ■ 01-60-920-930

**Germany** ■ 02103-29-12000

**Hong Kong** ■ 800 933 965

**Ireland** ■ 1800 555 049

**Italy** ■ 800 787980

**Japan** ■ 03-5547-0811

**Korea (South)** ■ 1544 7145

**Luxembourg** ■ 8002 2076

**The Netherlands** ■ 0800 0229592

**Norway** ■ 800-18859

**Singapore** ■ 65-67775366

**Spain** ■ 91-630-7050

**Sweden** ■ 020-790282

**Switzerland** ■ 055-254-22-11

**UK** ■ 01293-422-911

**USA** ■ 800-426-8157



---

Sample & Assay Technologies