

2023 m. vasaris

„QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit“ naudojimo instrukcija (vadovas)



2 versija



Skirta *in vitro* diagnostikai

Skirta naudoti su „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“



Katalogo numeris



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, VOKIETIJA



1130780LT

Turinys

Numatytoji paskirtis	4
Numatytasis naudotojas	4
Aprašymas ir veikimo principas	5
Santrauka ir paaiškinimas	5
Procedūros principas	5
Pateikiamos medžiagos.....	7
Rinkinio turinys.....	7
Komplekto komponentai.....	8
Būtinoms, bet nepateikiamoms priemonėms.....	9
Papildomi reagentai	9
Eksploataciniai reikmenys.....	9
Įranga.....	9
Įspėjimai ir atsargumo priemonės.....	10
Saugos informacija.....	10
Avarinė informacija.....	11
Atsargumo priemonės	11
Šalinimas.....	12
Reagentų laikymas ir naudojimas.....	13
Stabilumas naudojant.....	13
Bandinių laikymas ir naudojimas	14
Procedūra.....	15
Protokolas: Genominės DNR išskyrimas iš FFPE audinių pjūvių	21

Kokybės kontrolė	25
Apribojimai.....	26
Eksploatacinių savybių charakteristikos	27
Trikčių šalinimo vadovas	28
Simboliai	29
Priedas: Apdorojimas	32
Užsakymo informacija	33
Dokumento peržiūrų istorija.....	34

Numatytoji paskirtis

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ – tai sistema, naudojanti silicio membranos technologiją („QIAamp“) genomo DNR išskyrimui ir išgryninimui iš formalinu fiksuotų, parafine esančių (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) biologinių mėginių.

Prietaisas skirtas rankinio mėginių paruošimo tikslais ir nesuteikia kokybinių ar kiekybinių tyrimų rezultatų.

Numatytasis naudotojas

Šis gaminys skirtas naudoti tik specialistams, pavyzdžiui, technikams ir gydytojams, susipažinusiems su molekulinės biologijos metodais, skirtais *in vitro* diagnostikai (IVD).

Aprašymas ir veikimo principas

Santrauka ir paaiškinimas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ naudojamas DNR iš FFPE audinių pjūvių gryninti. Prietaisas naudoja plačiai priimtą „QIAamp DNR“ mikrotechnologiją genomo ir mitochondrijų DNR išgryninti iš mažų mėginių tūrių ar dydžių. Rinkinys sujungia selektyvaus silicio dioksido membranos surišimo savybes ir lanksčius eliuavimo tūrius.

Lizės sąlygos leidžia efektyviai išvalyti genominę DNR iš FFPE audinių pjūvių, nereikia inkubuoti per naktį. Inkubavimas aukštesnėje temperatūroje suvirškinus proteinazės K iš dalies pašalina formalino susiejimą iš išsiskyrusios DNR, o tai gali pagerinti išėigą ir DNR veikimą pasrovinio pritaikymo tyrimuose. Atkreipkite dėmesį, kad DNR, išskirta iš FFPE mėginių, paprastai yra mažesnės molekulinės masės nei DNR iš šviežių ar šaldytų mėginių. Suskaidymo laipsnis priklauso nuo mėginio tipo ir amžiaus bei fiksavimui naudojamų sąlygų.

Po mėginio lizės paprasta „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ procedūra tinka keliems mėginiams apdoroti vienu metu.

Naudotojas atsako už sistemos eksploatacines savybes, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima QIAGEN® eksploatacinių savybių tyrimai, aprašyti šiame vadove.

Procedūros principas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ procedūra susideda iš 6 etapų (1 pav.).

- Parafino pašalinimas: parafinas ištirpinamas ksilene ir pašalinamas.
- Lizavimas: mėginys lizuojamas 56 °C temperatūroje denatūravimo sąlygomis naudojant proteinazę K.
- Šildymas: inkubuojant 90 °C temperatūroje, formalino susiejimas yra atvirkštinis.

- Surišimas: DNR prisijungia prie membranos ir pratekėjusios teršalų frakcijos.
- Plovimas: likę teršalai nuplaunami.
- Eliuavimas: iš membranos išplaunama gryna, koncentruota DNR.

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ procedūra




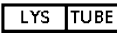

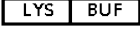
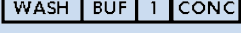

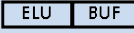




1 pav. „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ procedūra.

Pateikiamos medžiagos

Rinkinio turinys

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“	(50)
Katalogo nr.	60404
Ruošinių skaičius	50

	Identifikatorius	Simboliai	Kiekis
„QIAamp MinElute [®] “	„QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes“ („QIAamp MinElute“ kolonėlės su plovimo mėgintuvėliais)		50
WT	„Wash Tubes“ (Plovimo mėgintuvėliai) (2 ml)		3 × 50
ET	„Elution Tubes“ (Eliuavimo mėgintuvėliai) (1,5 ml)		50
LT	„Lysis Tubes“ (Lizės mėgintuvėliai) (2 ml)		50
ATL	„Tissue Lysis Buffer“ (Audinių lizės buferis)		10 ml
AL	„Lysis Buffer“ ^{**} (Lizės buferinis tirpalas [*])		12 ml
AW1	„Wash Buffer 1“ ^{**} (1 plovimo buferinis tirpalas [*]) (koncentratas)		19 ml
AW2	„Wash Buffer 2“ (2 plovimo buferinis tirpalas [†]) (koncentratas)		13 ml
ATE	„Elution Buffer“ (Eliuavimo buferinis tirpalas [†])		12 ml
PK	„Proteinase K“ (Proteinazė K)		1,25 ml
–	Naudojimo instrukcija (vadovas)		1

* Sudėtyje yra guanidino druskos. Nesuderinama su dezinfekantais, kurių sudėtyje yra baliklio. Žr. p. 10, „Įspėjimai ir atsargumo priemonės“.

† Sudėtyje yra konservanto natrio azido.

Komplekto komponentai

Pagrindiniai rinkinio komponentai paaiškinti toliau.

1 lentelė. Veikliosios medžiagos tiekiamuose reagentuose

Reagentas		Aktyvus (-ūs) ingredientas (-ai)	Koncentracija (m/m) [%]
Simbolis	Pavadinimas		
ATL	„Buffer ATL“	Natrio dodecilo sulfatas	Nuo ≥ 1 iki < 10
AL	„Buffer AL“	Guanidino hidrochloridas Maleino rūgštis	Nuo > 30 iki < 50 Nuo $\geq 0,1$ iki < 1
AW1	„Buffer AW1“	Guanidino hidrochloridas Etanolis	Nuo ≥ 50 iki < 70 Nuo ≥ 10 iki < 90
AW2	„Buffer AW2“	Etanolis	Nuo ≥ 10 iki < 90
ATE	„Buffer ATE“	„None“ (nėra)	-
PK	Proteinase K (Proteinazė K)	Proteinazė K	Nuo ≥ 1 iki < 10

Siekiant sumažinti bet kokio neigiamo poveikio diagnostikos rezultatams, gautiems po DNR išskyrimo, riziką, turėtų būti naudojamos tinkamos kontrolinės medžiagos pasrovinio pritaikymo procedūroms.

Būtinės, bet nepateikiamos priemonės

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose („Safety Data Sheet“, SDS), kuriuos gali pateikti gaminio tiekėjas.

Papildomi reagentai

- Ksilenas
- Etanolis (96–100 %)*

Eksploataciniai reikmenys

- Jei nuspręsite nenaudoti rinkinyje pateiktų mėgintuvėlių, rekomenduojame 1,5 arba 2 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlius (lizės etapams) ir 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlius (eliuavimo etapams) (pvz., galima įsigyti iš „Sarstedt®“, kat. Nr. 72.690). Rekomenduojame kūgio formos mėgintuvėlius su saugiais dangteliais be „DNase“ / „RNase“. Naudotojas atsako už sistemos eksploatacines savybes, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima QIAGEN eksploatacinių savybių tyrimai.
- Pipetės ir pipečių antgaliai (siekdami išvengti kryžminio užteršimo, primygtinai rekomenduojame pipečių antgalius su aerolio barjeriais)

Įranga†

- Termostatinis maišytuvas‡, šildomasis žiedinis maišymo inkubatorius, kaitinimo blokas arba vandens vonelė, galinti inkubuoti esant 56 °C, 70 °C ir 90 °C temperatūrai
- Mikrocentrifuga† (su 2 ml mėgintuvėliams skirtu rotoriumi)
- Purtytuvas

* Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletiketono.

† Prieš naudodami įsitikinkite, kad visi instrumentai patikrinti ir sukalibruoti pagal gamintojo rekomendacijas.

‡ Siekdami užtikrinti, kad mėginiai būtų tinkamai apdoroti taikant „QIAamp DSP DNA FFPE“ procedūras, primygtinai rekomenduojame instrumentus kalibruoti pagal gamintojų rekomendacijas.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Remiantis QIAGEN rizikos valdymu, visos numatytos rizikos kontrolės priemonės buvo įgyvendintos kuriant gaminį. Bendroji liekamoji rizika laikoma priimtina, o prietaiso naudojimas laikomas saugiu. Šiame vadove pateikiamos instrukcijos, įspėjimai ir atsargumo priemonės, užtikrinančios, kad įrenginys būtų saugus ir veiktų. Jų reikia griežtai laikytis.

Atminkite, kad gali prireikti pasižiūrėti vietos teisės aktus, kuriais nustatyta, kaip apie rimtus su šiuo prietaisu susijusius incidentus pranešti gamintojui ir (arba) jo įgaliotajam atstovui ir šalies, kurioje yra naudotojas ir (arba) pacientas, reguliuojančiajai institucijai.

Saugos informacija

Dirbdami su cheminėmis medžiagomis, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDS). Jie pateikiami patogiu ir kompaktišku PDF formatu internete www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jo komponentų SDS.

DĖMESIO

NEPILKITE baliklio ar rūgštinių tirpalų tiesiai į mėginių ruošimo atliekas.



- „Buffer AL“ ir „Buffer AW1“ sudėtyje yra guanidino hidroklorido. Susijungęs su balikliu, gali sudaryti intensyviai reaguojančių mišinių.
- Jei skystis, kuriame yra šių buferinių tirpalų, išliejamas, valykite tinkamu laboratoriniu plovikliu ir vandeniu. Jei išlietame skystyje yra potencialiai užkrečiamų medžiagų, atitinkamą vietą iš pradžių nuvalykite laboratoriniu plovikliu ir vandeniu, tada 1 % (v/v) natrio hipochloritu.

- Bandiniai ir mėginiai gali būti užkrečiami. Mėginių ir tyrimų atliekas išmeskite laikydamiesi vietinių saugos procedūrų.

Avarinė informacija

CHEMTREC

JAV ir Kanada 1-800-424-9300

Už JAV ir Kanados ribų +1 703-527-3887

Atsargumo priemonės

Buffer AL



Sudėtyje yra: guanidino hidrochlorido ir maleino rūgšties. Įspėjimas! Gali būti kenksminga prarijus arba įkvėpus. Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Gali sukelti alerginę odos reakciją. Jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją. PATEKUS Į AKIS: atsargiai plauti vandeniu kelias minutes. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu yra ir jeigu galima lengvai tai padaryti. Toliau plauti akis. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. PATEKUS ANT ODOS: atsargiai plauti dideliu kiekiu muilo ir vandens. Jeigu sudirginama oda: kreiptis į gydytoją. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

Buffer ATL



Įspėjimas! Nestipriai dirgina odą. Jeigu sudirginama oda: kreiptis į gydytoją.

Buffer AW1



Sudėtyje yra guanidino hidrochlorido. Įspėjimas! Kenksminga prarijus arba įkvėpus. Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Pasijutus blogai, skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Turinį / talpyklą perduoti patvirtintai atliekų šalinimo įmonei. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines / dėvėti apsauginius drabužius / naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

Proteinase K



Sudėtyje yra: proteinazės K. Pavojus! Nestipriai dirgina odą. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomų arba apsunkinti kvėpavimą. Stengtis neįkvėpti dulkių / dūmų / dujų / rūko / garų / aerosolio. Turinį / talpyklą perduoti patvirtintai atliekų šalinimo įmonei. Jeigu pasireiškia respiracinių simptomų: skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. ĮKVĖPUS: jeigu nukentėjusiajam sunku kvėpuoti, išnešti jį į gryną orą; jam būtina ramybė ir padėtis, leidžianti laisvai kvėpuoti. Naudoti kvėpavimo takų apsaugos priemones.

Šalinimas

Atliekose yra mėginių ir reagentų. Šiose atliekose gali būti nuodingų medžiagų arba infekcijos sukėlėjų, todėl jas reikėtų tinkamai pašalinti. Atliekų šalinimo procedūrų ieškokite vietiniuose saugos teisės aktuose.

Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose („Safety Data Sheet“, SDS). Jie pateikiami PDF formatu internete www.qiagen.com/safety – čia galite rasti, peržiūrėti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN rinkinio ir jo komponentų SDS.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Atvežus „QIAamp MinElute“ kolonėles, jas reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje ir galima naudoti iki galiojimo datos, nurodytos ant rinkinio dėžutės.

Visi buferiai gali būti laikomi kambario temperatūroje (15–25 °C) ir yra stabilūs iki rinkinio galiojimo datos, jei rinkinys neatidarytas.

Stabilumas naudojant

Paruoštą „Buffer AW1“ ir AW2 galima laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C) iki vienu metų arba iki rinkinio galiojimo pabaigos datos, priklausomai nuo to, kuris laikas trumpesnis.

Bandinių laikymas ir naudojimas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ sistema buvo sukurta naudoti su FFPE mėginiais.

DNR stabilumas priklauso nuo įvairių veiksnių, pavyzdžiui, mėginio surinkimo, tvarkymo, paruošimo ir laikymo sąlygų, kurios gali turėti įtakos jo panaudojimui tolesnėse srityse. Svarbu paskaityti konkrečios pasrovinio pritaikymo procedūros naudojimo instrukciją ir (arba) patikrinti bei patvirtinti visą darbo eigą, kad nustatytų tinkamas sąlygas.

Bendra informacija apie FFPE mėginių surinkimo, tvarkymo, paruošimo ir laikymo sąlygų laboratorines procedūras pateikiama ISO 20166-3:2018 „Molekulinės in vitro diagnostikos tyrimai. Specifikacijos, skirtos procesams prieš FFPE audinio tyrimą. 3 dalis. Išskirta DNR“ ir CLSI MM13-A „mėginių paėmimas, transportavimas, paruošimas ir saugojimas naudojant molekulinis metodus – patvirtintas vadovas“.

DNR eliuuojama „Buffer ATE“ ir yra iš karto paruošta naudoti amplifikacijos reakcijose arba saugoti (sąlygos priklauso nuo naudotojo reikalavimų). Atitinkamų rinkinių vadovuose ieškokite rekomenduojamų laikymo sąlygų konkrečioms QIAGEN pasrovinio pritaikymo procedūroms.

Procedūra

Svarbi informacija prieš pradėdant

- Visi „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ sudėtyje esantys reagentai numatyti naudoti tik su kitais reagentais iš to paties „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“. Kad rinkinys optimaliai veiktų, negalima naudoti reagentų pakaitalų.
- Gavę rinkinį patikrinkite, ar nepažeisti komplekto komponentai. Jei pakuotės arba buferio buteliai pažeisti, susisiekite su QIAGEN technine tarnyba arba vietiniu platintoju. Jei skystis išsiliejo, žr. „Įspėjimai ir atsargumo priemonės“, p. 10. Nenaudokite pažeistų rinkinio komponentų, nes gali prasčiau veikti rinkinys.
- Nenaudokite rinkinio komponentų iš kitų rinkinių su šiuo metu naudojamu rinkiniu, nebent partijos numeriai identiški.
- Rinkinio reagentų neužterškite mikroorganizmais.
- Šį rinkinį gali naudoti tik personalas, išmokytas atlikti *in vitro* diagnostikos laboratorinę praktiką.
- Tvarkydami reagentus ir mėginius, visuomet mūvėkite latekso arba vinilo pirštines, kad neužterštumėte nuo odos paviršiaus arba dulketos laboratorinės įrangos. Nuo rankų ir dulkių dalelių gali būti pernešamos bakterijos ir pelėsiai, kurie yra dažni taršos šaltiniai. Dažnai keiskite pirštines ir laikykite mėgintuvėlius uždengtus.
- Nepanaudoti buferiai, pratekėjusios frakcijos ir mėginių likučiai turi būti sunaikinti laikantis vietinių procedūrų.
- Jei naudojate savo plastikinius įrankius, per visą valymo procedūrą rekomenduojama naudoti vienkartinius 1,5–2 ml polipropileno kūginius mėgintuvėlius su saugiais dangteliais, kuriuose nėra „DNase“ / „RNase“.
- Visus centrifugavimo veiksmus atlikite kambario temperatūroje (15–25 °C).
- Visi buferiai turi būti laikomi kambario temperatūroje (15–25 °C) ir prieš naudodami juos gerai išmaišyti.

- Norėdami naudoti 9 veiksmė, termomikserį arba šildomuosius orbitinius inkubatorius nustatykite 56 °C. Jei termomikserio arba šildomojo orbitinio inkubatoriaus nėra, vietoje jo galima naudoti šildymo bloką arba vandens vonią.
- Jei „Buffer AL“ arba „Buffer ATL“ yra nuosėdų, ištirpinkite kaitindami iki 70 °C ir švelniai maišydami.
- Įsitikinkite, kad „Buffer AW1“ ir „Buffer AW2“ buvo paruošti pagal toliau pateiktas instrukcijas.
- Kokybės kontrolės procedūroms QIAGEN naudoja funkcinio rinkinio išleidimo tyrimus kiekvienai atskirai rinkinio partijai. Todėl nemišykite reagentų iš skirtingų rinkinių partijų ir nemišykite atskirų reagentų iš skirtingų reagentų partijų.

Bufnerinių tirpalų paruošimas

„Buffer ATL“ paruošimas

- Prieš pradėdami procedūrą patikrinkite, ar „Buffer ATL“ nesusidarė nuosėdų. Jei reikia, ištirpinkite kaitindami iki 70 °C ir švelniai maišydami.

„Buffer AL“ paruošimas

- Prieš pradėdami procedūrą patikrinkite, ar „Buffer AL“ nesusidarė nuosėdų. Jei reikia, ištirpinkite kaitindami iki 70 °C ir švelniai maišydami.

„Buffer AW1“ paruošimas

- Įpilkite 25 ml etanolio (96–100 %)* į butelį, kuriame yra 19 ml koncentruoto buferio „Buffer AW1“. Pažymėkite žymimąjį langelį buteliuko etiketėje, kad nurodytumėte, jog buvo pridėta etanolio. Paruoštą „Buffer AW1“ galima laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C) iki 1 metų arba iki rinkinio galiojimo pabaigos datos, priklausomai nuo to, kuris laikas trumpesnis. Rekomenduojame paruošimo datą užrašyti ant buferio etiketės.

Pastaba. Prieš pradėdami procedūrą, sumaišykite paruoštą „Buffer AW1“ purtydami.

„Buffer AW2“ paruošimas

- Įpilkite 30 ml etanolio (96–100 %)* į butelį, kuriame yra 13 ml koncentruoto buferio „Buffer AW2“. Pažymėkite žymimąjį langelį buteliuko etiketėje, kad nurodytumėte, jog buvo pridėta etanolio. Paruoštą „Buffer AW2“ galima laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C) iki 1 metų arba iki rinkinio galiojimo pabaigos datos, priklausomai nuo to, kuris laikas trumpesnis. Rekomenduojame paruošimo datą užrašyti ant buferio etiketės.

Pastaba. Prieš pradėdami procedūrą, sumaišykite paruoštą „Buffer AW2“ purtydami.

Pradinė medžiaga

Pradinė DNR gryninimo medžiaga yra supjaustytos FFPE audinio dalys (idealiu atveju – ką tik supjaustytos). Viename preparate galima sujungti kelis pjūvius. Jei neturite informacijos apie pradinės medžiagos pobūdį, rekomenduojame pradėti nuo ne daugiau kaip 3 pjūvių vienam preparatui.

* Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletiketono.

Naudotojas turėtų optimizuoti pjūvių skaičių, pjūvio storį ir jo paviršiaus plotą bet kokioms savo laboratorijoje naudojamoms procedūroms. Jei rinkinys naudojamas kartu su QIAGEN pasrovinio pritaikymo procedūromis, vadovaukitės atitinkamame vadove pateiktomis instrukcijomis.

Tvarkymo procedūra siekiant išvengti kryžminio užteršimo

Dėl nukleorūgščių amplifikacijos technologijų jautrumo dirbant su „QIAamp MinElute“ kolonėlėmis reikia laikytis toliau nurodytų atsargumo priemonių, kad būtų išvengta kryžminio mėginių užteršimo.

- Neperpildykite mėgintuvėlių audiniu.
- Pakeiskite skalpelius tarp mėginių grandydami.
- Atsargiai užtepkite mėginį arba tirpalą ant „QIAamp MinElute“ kolonėlės. Nedrėkindami kolonėlės krašto, pipete supilkite mėginį į „QIAamp MinElute“ kolonėlę.
- Perkeldami skirtingus skysčius, visuomet keiskite pipetės antgalius. Rekomenduojame naudoti aerosolinius barjerinius pipetės antgalius.
- Visada naudokite naujus plovimo mėgintuvėlius, kai plaunate mėginius.
- Prieš maišydami ir centrifuguodami įsitikinkite, kad mėgintuvėlių dangteliai visiškai uždaryti.
- Prieš centrifuguodami įsitikinkite, kad „QIAamp MinElute“ kolonėlė visiškai uždaryta.
- Po visų impulsinio sukurio ir 90 °C inkubacijos etapų trumpai centrifuguokite mikrocentrifugos mėgintuvėlius, kad pašalintumėte lašus iš dangtelių vidaus.
- Vienu metu atidarykite tik vieną „QIAamp MinElute“ kolonėlę ir stenkitės, kad nesusidarytų aerozolių.
- Visada keiskite skalpelius tarp mėginių.
- Perkeldami skirtingus skysčius, visuomet keiskite pipetės antgalius. Kad sumažintumėte kryžminį užteršimą, rekomenduojame naudoti aerozolių barjerinius pipečių antgalius ir vengti kelių pakopų pipečių.
- Visada mūvėkite vienkartinės pirštines ir reguliariai tikrinkite, ar jos gali būti užterštos mėginio medžiaga. Išmeskite pirštines, jei įtariate, kad jos užterštos.
- Vienu metu atidarykite tik vieną mėgintuvėlį.

Centrifugavimas

„QIAamp MinElute“ kolonėlės tilps į daugumą standartinių 1,5–2 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlių. „QIAamp MinElute“ kolonėlės centrifuguojamos maždaug 6 000 x g greičiu siekiant sumažinti centrifugos triukšmą. Centrifugavimas visu greičiu nepagerins DNR išeigų. Tačiau reikia centrifuguoti „QIAamp MinElute“ kolonėles visu greičiu dviem procedūros etapais: sausojo centrifugavimo etapu po membranų plovimo ir eliuavimo procedūrų. Taip pat reikia centrifuguoti visu greičiu, kad apdorojus ksilenu ir išplovus etanolium mėginys sumažėtų.

Visi centrifugavimo veiksmai turi būti atliekami kambario temperatūroje (15–25 °C). Dėl žemos centrifugavimo temperatūros ekstrahavimas gali būti neoptimalus.

„QIAamp MinElute“ kolonėlių apdorojimas mikrocentrifugoje

- Visada uždarykite „QIAamp MinElute“ kolonėles, prieš dėdami jas į mikrocentrifugą.
- Nelieskite „QIAamp MinElute“ kolonėlės membranos pipetės antgaliu.
- Pratekančiose frakcijose gali būti pavojingų atliekų, todėl jas reikia tinkamai šalinti.
- Norint veiksmingai lygiagrečiai apdoroti kelis mėginius rekomenduojama pripildyti stovą plovimo mėgintuvėlių, į kuriuos po centrifugavimo procedūros galima perkelti „QIAamp MinElute“ kolonėles. Naudotus pratekėjusius plovimo mėgintuvėlius galima išmesti, o naujus plovimo mėgintuvėlius su „QIAamp MinElute“ kolonėlėmis galima įdėti tiesiai į mikrocentrifugą.
- Per visą procesą užtikrinkite visišką mėginio atsekamumą.

Išgrynintosios DNR eliuavimas

Jei pasrovinio pritaikymo procedūroms reikia naudoti mažus pradinius tūrius (pvz., kai kurie PGR tyrimai), labiau koncentruotas eliuatas gali padidinti tyrimo jautrumą, tačiau taip pat gali padidėti galimų inhibitorių koncentracija.

Padidėjus eliuavimo tūriui, sumažės DNR koncentracija eliuate.

Išgaunamo eliuato tūris gali būti maždaug 5 µl mažesnis nei „Buffer ATE“ tūris, užpildtas „QIAamp MinElute“ kolonėlėje. Pavyzdžiui, eliuato tūris yra 20 µl, todėl gaunama ≥ 15 µl eliuato. Išgaunamo eliuato tūris priklauso nuo mėginio pobūdžio.

Naudotojas yra atsakingas už eliuavimo tūrio optimizavimą bet kokioms jo laboratorijoje naudojamoms procedūroms. Rekomenduojamus eliuavimo kiekius, reikalingus konkrečiai QIAGEN pasrovinio pritaikymo procedūrai, rasite rinkinio vadovuose.

Išiega gali padidėti, jei kolonėlė prieš centrifuguojant inkubuojama su „Buffer ATE“ kambario temperatūroje, pavyzdžiui, 5 minutes. Eliuotą DNR galima surinkti į 1,5 ml eliuavimo mėgintuvėlius (pateikiami). Eliuotos DNR laikymo sąlygos priklauso nuo naudotojo nustatytų reikalavimų. Rinkinių vadovuose ieškokite rekomenduojamų laikymo sąlygų konkrečioms QIAGEN pasrovinio pritaikymo procedūroms.

Protokolas: Genominės DNR išskyrimas iš FFPE audinių pjūvių

Procedūra

1. Skalpelium nupjaukite parafino perteklių nuo mėginio bloko.
2. Atlikite pjūvius laikydamiesi standartinės laboratorinės praktikos (žr. „Pradinė medžiaga“, p. 17). Naudotojas turėtų optimizuoti pjūvių skaičių, pjūvio storį ir jo paviršiaus plotą bet kokioms savo laboratorijoje naudojamoms procedūroms. Užtikrinkite, kad mėginių atsekamumas būtų išlaikytas per visą procedūrą.
3. Nedelsdami nugrandykite audinį nuo pjūvių naudodami sterilų skalpelį lizės mėgintuvėlyje (yra komplekte). Įsitinkite, kad visas turimas audinys įdėtas į mėgintuvėlį. Į mėginį įpilkite 1 ml ksileno, uždarykite dangtį ir intensyviai maišykite, kol parafinas ištirps (pvz., 10 sek.). Mėgintuvėlis turi būti visiškai uždarytas, kad išvengtumėte ksileno išsiliejimo, kryžminio mėginių užteršimo ir galimo kontakto su ksilenu.

Pastaba. Dūmų gaubtuose ar kituose atitinkamuose izoliavimo įrenginiuose naudokite ksileną.

4. Centrifuguokite visu greičiu maždaug 2 min. kambario temperatūroje, kad surinktumėte audinių nuosėdas. Jei nesusidarė audinio nuosėdų, pakartokite šį veiksmą.

Pastaba. Dėl žemos centrifugavimo temperatūros ekstrahavimas gali būti neoptimalus.

5. Nuimkite supernatantą pipete ir išmeskite. Išlaikykite granulę.

Supernatante yra ksileno, o šis yra pavojingos atliekos ir turi būti tinkamai pašalintas laikantis vietinių taisyklių.

6. Į audinių nuosėdas įpilkite 1 ml etanolio (96–100 %) ir gerai išmaišykite.

Etanolis ištraukia ksileno likučius iš mėginio ir turi būti tinkamai pašalintas.

7. Centrifuguokite visu greičiu maždaug 2 min. kambario temperatūroje.

Atsargiai pipete pašalinkite supernatantą. Nenuimkite nė kiek granulių.

Atsargiai, naudodami ploną pipetės antgalį, pašalinkite etanolio likučius. Atidarykite mėgintuvėlį ir inkubuokite 15–40 °C temperatūroje, kol išgaruos visas likęs etanolis. Kad ekstrahavimas būtų sėkmingas, labai svarbu pašalinti etanolio likučius.

Pastaba. Žemesnė inkubacijos temperatūra sulėtina išgaravimo laiką, o aukštesnėje temperatūroje gali perdžiūti granulės, todėl jas sunku sustabdyti.

8. Pakartotinai sustabdykite nuosėdas 180 µl „Buffer ATL“. Įpilkite 20 µl proteinazės K ir sumaišykite.

Pastaba. Granulės turi būti gerai pakartotinai sustabdytos ATL buferyje, kad būtų užtikrinta didžiausia išeiga.

9. Inkubuokite 56 °C temperatūroje maždaug 1 val. (kol mėginys bus visiškai lizuotas).

10. Inkubuokite 90 °C temperatūroje 1 val.

Inkubavimas 90 °C temperatūroje „Buffer ATL“ iš dalies pakeičia nukleorūgščių modifikaciją formaldehidu. Trumpesnis inkubacijos laikas arba žemesnė inkubavimo temperatūra gali turėti įtakos DNR kokybei ir kiekiui. Jei naudojate tik vieną šildymo bloką, palikite mėginį kambario temperatūroje po inkubavimo procedūros 56 °C temperatūroje, kol kaitinimo blokas pasieks 90 °C.

11. Trumpai centrifuguokite mėgintuvėlį, kad pašalintumėte lašelius nuo dangtelio vidinės pusės.

12. Į mėginį įpilkite 200 µl „Buffer AL“ ir gerai sumaišykite. Tada įpilkite 200 µl etanolio (96–100 %) ir vėl gerai išmaišykite.

Labai svarbu, kad mėginys, „Buffer AL“ ir etanolis būtų iškart kruopščiai sumaišomi sukuryje arba pipete, kad susidarytų vienalytis tirpalas. „Buffer AL“ ir etanolis gali būti iš anksto sumaišomi ir maišomi vienu žingsniu, kad sutaupytumėte laiko apdorodami kelis mėginius. Pridėjus „Buffer AL“ ir etanolio, gali susidaryti baltų nuosėdų. Šios nuosėdos netrukdo „QIAamp“ procedūrai. Visada naudokite šviežią mišinį ir išmeskite iš karto panaudoję.

13. Trumpai centrifuguokite mėgintuvėlį, kad pašalintumėte lašelius nuo dangtelio vidinės pusės.
14. Atsargiai perkelkite visą lizatą į „QIAamp MinElute“ kolonėlę (2 ml plovimo mėgintuvėlyje), nesudrėkindami krašto, uždarykite dangtelį ir centrifuguokite 6 000 x g \geq 1 min. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį (yra komplekte) ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį su pratekėjusia frakcija.
- Jei po centrifugavimo procedūros lizatas nevisiškai prasiskverbė per membraną, centrifuguokite dar kartą didesniu greičiu, kol „QIAamp MinElute“ kolonėlė bus tuščia.
15. Atsargiai atidarykite „QIAamp MinElute“ kolonėlę ir įpilkite 500 μ l paruošto buferio „Buffer AW1“ nesudrėkindami krašto. Uždarykite dangtelį ir centrifuguokite 6 000 x g \geq 1 min. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį su pratekėjusia frakcija.
16. Atsargiai atidarykite „QIAamp MinElute“ kolonėlę ir įpilkite 500 μ l paruošto buferio „Buffer AW2“ nesudrėkindami krašto. Uždarykite dangtelį ir centrifuguokite 6 000 x g \geq 1 min. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį su pratekėjusia frakcija.
- Reikėtų vengti kontakto tarp „QIAamp MinElute“ kolonėlės ir srauto. Būtinai subalansuokite centrifugos rotorius. Kai kurie centrifugos rotoriai lėtėjant gali vibruoti, todėl srautas, kuriame yra etanolio, susiliečia su „QIAamp MinElute“ kolonėle. Būkite atsargūs nuimdami „QIAamp MinElute“ kolonėlę ir plovimo mėgintuvėlį nuo rotoriaus, kad srautas nesiliestų su „QIAamp MinElute“ kolonėle.
17. Centrifuguokite visu greičiu (maždaug 20 000 x g) maždaug 3 min., kad membrana išdžiūtų.
- Etanolio pernešimas į eliuatą gali trukdyti kai kurioms pasrovinio pritaikymo procedūroms.

18. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 1,5 ml eliuavimo mėgintuvėlį (yra komplekte) ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį, per kurį teka. Atsargiai atidarykite „QIAamp MinElute“ kolonėlės dangtelį ir membranos centre užtepkite 20–200 µl „Buffer ATE“.

Svarbu. Jei naudojate mažus eliuavimo tūrius (< 50 µl), įpilkite „Buffer ATE“ į membranos centrą, kad užtikrintumėte visišką prijungtos DNR eliuavimą. „QIAamp MinElute“ kolonėlės suteikia lankstumo pasirenkant eliuavimo tūrį. Pasirinkite tūrį pagal pasrovinio pritaikymo procedūros reikalavimus. Eliuato tūris bus maždaug 5 µl mažesnis nei eliuato tirpalo tūris, pripiltas kolonėlėje.

19. Uždarykite dangtelį ir inkubuokite kambario temperatūroje (15–25 °C) bent minutę. Centrifuguokite visu greičiu (apie 20 000 x g) minutę arba ilgiau.

Inkubuojant „QIAamp MinElute“ kolonėlę su „Buffer ATE“ maždaug 5 min. kambario temperatūroje prieš centrifuguojant, gali padidėti DNR išeiga.

Kokybės kontrolė

Taikant „QIAGEN“ ISO sertifikuotą kokybės vadybos sistemą, kiekviena „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“ partija tikrinama pagal nustatytas specifikacijas, kad būtų užtikrinta nuosekli gaminių kokybė.

Apribojimai

Rinkinio veikimas buvo nustatytas naudojant FFPE audinius genomo DNR išskyrimui.

Nepakankamas arba perteklinis fiksavimas gali turėti įtakos DNR kokybei, todėl tolesnių tyrimų rezultatai gali būti prastesni.

Formalino likučiai gali slopinti proteinazės K virškinimą, todėl prieš įdėdami mėginius, kruopščiai pašalinkite vandenį.

Naudotojas atsako už sistemos eksploatacines savybes, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima QIAGEN eksploatacinių savybių tyrimai.

Siekiant sumažinti neigiamo poveikio diagnostiniams rezultatams riziką, atliekant tolesnius tyrimus reikia naudoti tinkamas kontrolės priemones. Papildomam patvirtinimui rekomenduojama vadovautis Techninių reikalavimų derinimo tarptautinės konferencijos („International Conference on Harmonisation of Technical Requirements“, ICH) nuostatomis, pateiktomis dokumente „ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology“.

Visi gauti diagnostikos rezultatai turi būti vertinami kartu su kitais klinikiniais ar laboratoriniais rezultatais.

Naudojant „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“, RNR gali būti išgryninta su DNR, jei jos yra mėginyje.

Eksploatacinių savybių charakteristikos

Taikomas efektyvumo charakteristikas rasite gaminio puslapio www.qiagen.com išteklių skirtuke.

Trikčių šalinimo vadovas

Šis trikčių šalinimo vadovas gali būti naudingas šalinant atsiradusias problemas. Daugiau informacijos rasite mūsų techninės pagalbos centro svetainės puslapyje „Dažniausiai užduodami klausimai“ („Frequently Asked Questions“, FAQ) adresu www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. QIAGEN techninėse tarnybose dirbantys mokslininkai visada mielai atsakys į visus jums kilusius klausimus apie šiame vadove ir (arba) protokoluose pateiktą informaciją, mėginius ir tyrimų technologijas (kontaktinę informaciją rasite apsilankę www.qiagen.com).

Pastabos ir pasiūlymai

Užsikimšusi „QIAamp MinElute“ kolonėlė

- | | | |
|----|-------------------------------------|--|
| a) | Per daug pradinės medžiagos | Sumažinkite pradinės medžiagos kiekį. Labai svarbu naudoti tinkamą pradinės medžiagos kiekį (žr. p. 17). |
| b) | Per žema centrifugavimo temperatūra | Centrifugavimo temperatūra turi būti 15–25 °C. Kai kurios centrifugos gali atvėsti iki žemesnės nei 15 °C temperatūros, net jei nustatyta 20 °C. Dėl to gali susidaryti nuosėdų, ir jos gali užkimšti „QIAamp MinElute“ kolonėles. Jei taip atsitiks, nustatykite 15–25 °C centrifugavimo temperatūrą. |

Maža DNR išeiga

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Per daug pradinės medžiagos | Perkrovus „QIAamp MinElute Spin Column“, žymiai sumažėja nukleorūgščių išeiga. Sumažinkite pradinės medžiagos kiekį (žr. p. 17). |
| b) | DNR vis dar prijungta prie „RNeasy MinElute Spin Column“ membranai | Pakartokite DNR eliuavimą, bet prieš centrifuguodami inkubuokite „QIAamp MinElute Spin Column“ ant stalo 10 min. ATE buferiu (eliuavimo buferiu). |
| c) | Netinkamai laikomi buferiai / reagentai | Atvežus rinkinį, „QIAamp MinElute Spin Columns“ reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje. Patikrinkite tinkamą laikymo temperatūrą, nes ilgiau veikiant aukštesnei temperatūrai gali sumažėti veiksmingumas. |

Maža A_{260}/A_{280} reikšmė











Matuojant A_{260}/A_{280} , nukleorūgštis buvo skiedžiama vandeniu	Prieš matuodami grynumą, naudokite 10 mM Tris Cl, pH 7,5, o ne vandenį.
--	---

DNR neveikia gerai atliekant pasrovinio pritaikymo tyrimus / procedūras

Etanolio pemešimas	Centrifuguoti „QIAamp MinElute“ kolonėles visu greičiu reikia 2 procedūros etapais: Per antrąjį plovimą naudojant „Buffer AW2“ būtinai centrifuguokite $\geq 8000 \times g$ 2 minutes 15–25 °C temperatūroje, kad išdžiovintumėte „QIAamp MinElute Spin Column“ membraną. Po centrifugavimo procedūros kolonėlę atsargiai išimkite iš surinkimo mėgintuvėlio, kad kolonėlė nesiliestų su pratekėjusia frakcija. Tada įdėkite kolonėlę į naują surinkimo mėgintuvėlį ir centrifuguokite visu greičiu 5 min. Taip pat reikia centrifuguoti visu greičiu, kad po apdoravimo procedūros ksilenu ir plovimo procedūros etanolio mėginys sumažėtų.
--------------------	--





Simboliai

Naudojimo instrukcijose arba ant pakuočių ir etiketėse pateikti šie simboliai:

Simbolis	Simbolio apibrėžimas
 <N>	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti
	Tinka naudoti iki
	Šis gaminyis atitinka Europos reglamento 2017/746 <i>in vitro</i> diagnostikos medicinos priemonėms taikomus reikalavimus.
	<i>In vitro</i> diagnostikos medicinos priemonė
	Katalogo numeris
	Partijos numeris
	Medžiagos numeris (t. y. komponento ženklinimas etikete)
	Komponentai
	Sudėtyje yra
	Numeris

Simbolis

Simbolio apibrėžimas

	Visuotinis prekės numeris
Rn	R yra naudojimo instrukcijų peržiūrėtas leidimas, n – peržiūrėto leidimo numeris
	Temperatūros ribos
	Gamintojas
	Žr. naudojimo instrukcijas
	Saugoti nuo saulės šviesos
	Įspėjimas / dėmesio
	Proteinazė K
	Natrio azidas
	Gavus
	Įpylę į buteliuką etanolio, pažymėkite dabartinę datą _____

Simbolis	Simbolio apibrėžimas
EtOH	Etanolis
ADD	Papildymas
GuHCl	Guanidino hidrochloridas
MALEIC ACID	Maleino rūgštis
UDI	Unikalus priemonės identifikatorius

Priedas: Apdorojimas

Bendrasis naudojimas

Tvarkydami reagentus ir mėginius, visuomet mūvėkite latekso arba vinilo pirštines, kad neužterštumėte nuo odos paviršiaus arba dulkėtos laboratorinės įrangos. Nuo rankų ir dulkių dalelių gali būti pernešamos bakterijos ir pelėšiai, kurie yra dažni taršos šaltiniai. Dažnai keiskite pirštines ir laikykite mėgintuvėlius uždengtus. Rinkinio reagentų neužterškite mikroorganizmais.

Vienkartiniai plastikiniai indai

Per procedūrą rekomenduojama naudoti sterilius vienkartinius polipropileno mėgintuvėlius.

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. nr.
„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit“, skirtas genominei DNR išgryninti iš parafine esančių audinių		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR preparatų: 50 „QIAamp MinElute“ kolonėlių, proteinazė K, buferiai, plovimo mėgintuvėliai (2 ml), eliuavimo mėgintuvėliai (1,5 ml), lizės mėgintuvėliai (2 ml)	60404

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų gaminių garantinių įsipareigojimų ribojimą pateikta atitinkamoje QIAGEN rinkinio naudojimo instrukcijoje. QIAGEN rinkinių naudojimo instrukcijos pateikiamos svetainėje www.qiagen.com arba galite jų paprašyti QIAGEN techninės pagalbos tarnybos ar vietinio platintojo.

Dokumento peržiūrų istorija

Peržiūrėtas leidimas

Aprašas

R1, 2022 m. birželis

- Atnaujinkite į 2 rinkinio versiją, kad atitiktumėte IVDR
- Aprašymas ir veikimo principas skyriaus atnaujinimas
- Būtinoms, bet nepateikiamoms priemonėms skyriaus atnaujinimas
- Įspėjimai ir atsargumo priemonės skyriaus atnaujinimas
- Reagentų laikymas ir naudojimas skyriaus atnaujinimas
- Trikčių šalinimo vadovas skyriaus atnaujinimas
- Priedo atnaujinimas

R2, 2023 m. vasaris

- Atnaujintas skyrius „Mėginių laikymas ir naudojimas“

„QIAamp DSP DNA Kit“ ribotosios licencijos sutartis

Naudodamas šį gaminį, pirkėjas arba naudotojas sutinka su toliau išvardytomis sąlygomis.

1. Gaminį galima naudoti tik vadovaujantis su juo pateiktais protokolais, šiuo vadovu ir tik su komplekte esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio komplekto komponentus su j šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, pateiktuose www.qiagen.com. QIAGEN naudotojams pateikiami keli papildomi protokoliai. Šių protokolų QIAGEN kruopščiai nepatikrino ir neoptimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokoliai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Jei aiškiai nenurodyta licencijose, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis komplektas ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Pagal suteiktą licenciją šį komplektą ir jo komponentus galima naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Komplekto pirkėjas ir naudotojas sutinka nesiimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti anksčiau nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir turi atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių j savo intelektinę nuosavybę. Atnaujintas licencijos sąlygas žr. www.qiagen.com.

Prekių ženklai: QIAGEN[®], „Sample to Insight“[®], „QIAamp“[®], „MinElute“[®] (QIAGEN grupė); „Sarstedt“[®] („Sarstedt AG and Co.“); 2023-02 HB-3033-002 1130780LT © QIAGEN, 2023. Visos teisės saugomos.

Užsakymas www.qiagen.com/shop | Techninė pagalba support.qiagen.com |
Svetainė www.qiagen.com