

Brugsanvisning (håndbog) til QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit



Version 2



Til in vitro-diagnostisk brug

Til brug sammen med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Katalognummer



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND



1130780DA

Indhold

Tilsligtet anvendelse	4
Tilsligtet bruger	4
Beskrivelse og princip	5
Oversigt og forklaring	5
Funktionsprincip	5
Leverede materialer.....	7
Kittets indhold	7
Sættets komponenter.....	8
Påkrævede materialer, der ikke medfølger.....	9
Yderligere reagenser	9
Forbrugsvarer	9
Udstyr	9
Advarsler og forholdsregler.....	10
Sikkerhedsinformation	10
Oplysninger til brug i nødstilfælde.....	11
Forholdsregler	11
Bortskaffelse	12
Opbevaring og håndtering af reagenser	13
Stabilitet under brug	13
Prøveopbevaring og -håndtering.....	14
Procedure	15
Protokol: Isolering af genomisk DNA fra FFPE-vævssnit.....	21

Kvalitetskontrol	24
Begrænsninger	25
Ydelseskarakteristik	26
Fejlfindingsvejledning	27
Symboler	28
Appendiks: Behandling	31
Bestillingsinformation	32
Revisionshistorik for dokumentet	33

Tilsigtet anvendelse

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit er et system, der anvender silicamembranteknologi (QIAamp-teknologi) til isolering og oprensning af genomisk DNA fra formalinfikserede, paraffinindstøbte (FFPE) biologiske prøver.

Den er beregnet til manuel prøveklargøring og leverer ingen testresultater, hverken kvalitative eller kvantitative.

Tilsigtet bruger

Produktet er beregnet til brug af professionelle brugere, såsom laboratorieteknikere og læger, der er uddannet i molekylærbiologisk teknik til in vitro diagnostiske (IVD) formål.

Beskrivelse og princip

Oversigt og forklaring

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit anvendes til oprensning af DNA fra FFPE-vævssnit. Den bruger veletableret QIAamp DNA-mikroteknologi til oprensning af genomisk og mitokondrielt DNA fra små prøvevolumener eller -størrelser. Kittet kombinerer en silicabaseret membrans selektive bindingsegenskaber med fleksible elueringsmængder.

Lysisbetingelser gør det muligt at oprense genomisk DNA effektivt fra FFPE-vævssnit uden behov for inkubation natten over. Inkubation ved en forhøjet temperatur efter Proteinase K-fordøjelse fjerner delvist formalin-tværbinding af det frigivne DNA, hvilket potentielt forbedrer udbyttet såvel som DNA-ydelsen i efterfølgende analyser. Bemærk, at DNA isoleret fra FFPE-prøver normalt har en lavere molekylvægt end DNA fra friske eller frosne prøver. Graden af fragmentering afhænger af prøvens type og alder og de forhold, der anvendes til fiksering.

Efter prøvelysis er den simple QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit-procedure velegnet til samtidig behandling af flere prøver.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af QIAGEN®-ydelsesundersøgelser.

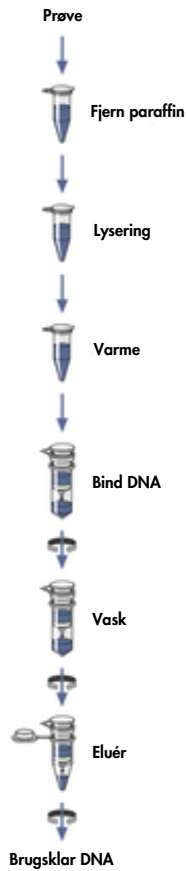
Funktionsprincip

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit-proceduren består af 6 trin (Figur 1):

- Fjernelse af paraffin: Paraffin opløses i xylene og fjernes.
- Lysis: Prøven lyses ved 56 °C under denatureringsforhold med Proteinase K.
- Varme: Inkubation ved 90 °C reverserer formalintværbinding.
- Binding: DNA binder sig til membranen og kontaminant strømmer igennem.

- Vask: Resterende kontaminanter vaskes væk.
- Eluér: Rent, koncentreret DNA elueres fra membranen.




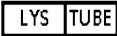

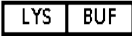


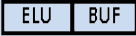


QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-procedure



Figur 1. QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit-procedure.

Leverede materialer

Kittets indhold

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Katalognr.			60.404
Antal klargøringer			50
	Identitet	Symboler	Mængde
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute kolonner med vaskerør)		50
WT	Vaskerør (2 ml)		3 × 50
ET	Elueringsrør (1,5 ml)		50
LT	Lysisrør (2 ml)		50
ATL	Vævslysisbuffer		10 ml
AL	Lysis Buffer* (lysisbuffer)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (vaskebuffer 1) (koncentrat)		19 ml
AW2	Vaskebuffer 2† (koncentrat)		13 ml
ATE	Elueringsbuffer		12 ml
PK	Proteinase K		1,25 ml
–	Brugsanvisning (Håndbog)		1

* Indeholder et guanidinsalt. Ikke kompatibel med desinfektionsmidler, der indeholder blegemiddel. Se side 10 for Advarsler og forholdsregler.

† Indeholder natriumazid som konserveringsmiddel.

Sættets komponenter

Hovedkomponenterne i kittet er forklaret nedenfor.

Tabel 1. Aktive indholdsstoffer i medfølgende reagenser

Reagens		Aktive indholdsstoffer	Koncentration (w/w) [%]
Symbol	Navn		
ATL	Buffer ATL	Natriumdodecylsulfat	≥1 til <10
AL	Buffer AL	Guanidinhydrochlorid Maleinsyre	>30 til <50 ≥0,1 til <1
AW1	Buffer AW1	Guanidinhydrochlorid Ethanol	≥50 til <70 ≥10 til <90
AW2	Buffer AW2	Ethanol	≥10 til <90
ATE	Buffer AVE	Ingen	-
PK	Proteinase K	Proteinase K	≥1 til <10

For at minimere risikoen for en negativ indvirkning på diagnostiske resultater genereret efter DNA-isolation skal der anvendes hensigtsmæssige kontroller for efterfølgende anvendelser.

Påkrævede materialer, der ikke medfølger

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Yderligere reagenser

- Xylen
- Ethanol (96-100 %)*

Forbrugsvarer

- Hvis der træffes en beslutning om ikke at bruge de medfølgende rør i kittet, anbefaler vi 1,5 eller 2 ml mikrocentrifugerør (til lyseringstrin) og 1,5 ml mikrocentrifugerør (til elueringstrin) (fås f.eks. fra Sarstedt® , kat.nr. 72.690). Vi anbefaler DNase/RNase-fri, koniske rør med tætsluttende låg. Det er brugerens ansvar at validere systemets ydelse for procedurer, der anvendes i deres laboratorium, og som ikke er dækket af QIAGEN-ydelsesundersøgelser.
- Pipetter og pipettespidser (til forhindring af krydskontaminering anbefaler vi på det kraftigste at anvende pipettespidser med aerosolskærme)

Udstyr†

- Thermomixer‡, opvarmet orbital inkubator, varmeblok eller vandbad, der kan inkubere ved 56 °C, 70 °C og 90 °C
- Mikrocentrifuge† med rotor til 2 ml rør
- Vortexer

* Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer, såsom metanol eller methylethylketon.

† Sørg for, at instrumenterne er kontrolleret og kalibreret i henhold til producentens anbefalinger inden brug.

‡ For at sikre, at prøverne er behandlet korrekt i QIAamp DSP DNA FFPE-procedurerne, anbefaler vi på det kraftigste, at instrumenter (f.eks. pipetter og varmeblokke) kalibreres i henhold til fremstillernes anbefalinger.

Advarsler og forholdsregler

Baseret på QIAGENS risikostyring blev alle tilsigtede risikokontrolforanstaltninger implementeret i produktdesignet. Den samlede resterende risiko anses for acceptabel, og brugen af enheden vurderes som sikker. Denne håndbog indeholder instruktioner, advarsler og forholdsregler for at sikre enhedens sikkerhed og ydelse. De skal følges nøje.

Vær opmærksom på, at du muligvis skal undersøge de lokale regler for indberetning af alvorlige hændelser, der er opstået i forbindelse med enheden, til producenten og/eller dennes autoriserede repræsentant og den kompetente myndighed i det land, hvor brugeren og/eller patienten er bosat.

Sikkerhedsinformation

Der skal altid anvendes laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemiske stoffer. Se de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere oplysninger. Disse er tilgængelige online i et praktisk og kompakt PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og alle kitkomponenter.

FORSIGTIG



Tilsæt IKKE blegemiddel eller sure opløsninger direkte til væskeaffaldet fra klargøringen af prøven.

- Buffer AL og Buffer AW1 indeholder guanidinhydrochlorid, som kan danne højt reaktive forbindelser, når de kombineres med blegemiddel.
- Hvis der spildes væske, der indeholder disse buffere, rengøres med egnet rengøringsmiddel til laboratorier og vand. Hvis den spildte væske indeholder potentielt smittefarlige stoffer, rengøres det påvirkede område først med rengøringsmiddel til laboratorier og vand og dernæst med 1 % (v/v) natriumhypochlorit.

- Prøver og præparater er potentielt smitsomme. Prøve- og analyseaffald skal bortskaffes i henhold til lokale sikkerhedsprocedurer.

Oplysninger til brug i nødstilfælde

CHEMTREC

USA og Canada 1-800-424-9300

Uden for USA og Canada: +1 703-527-3887

Forholdsregler

Buffer AL



Indeholder: guanidinhydrochlorid og maleinsyre. Advarsel! Kan være skadelig ved indtagelse eller ved indånding. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Kan forårsage allergisk hudreaktion. Ved vedvarende øjenirritation: Søg lægehjælp. VED KONTAKT MED ØJNENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. VED KONTAKT MED HUDEN: Vask grundigt med sæbe og vand. Ved hudirritation: Søg lægehjælp. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

Buffer ATL



Advarsel! Forårsager let hudirritation. Ved hudirritation: Søg lægehjælp.

Buffer AW1



Indeholder: guanidinhydrochlorid. Advarsel! Skadelig ved indtagelse eller ved indånding. Forårsager hudirritation. Forårsager alvorlig øjenirritation. Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge, hvis du er utilpas. Indholdet/beholderen bortskaffes til godkendt behandlingsanlæg. Forurenet tøj tages af og vaskes, før det bruges igen. Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenbeskyttelse/ansigtsbeskyttelse.

Proteinase K



Indeholder: Proteinase K. Fare! Forårsager let hudirritation. Kan forårsage allergi- eller astmasymptomer eller åndedrætsbesvær ved indånding. Undgå indånding af pulver/røg/gas/tåge/damp/spray. Indholdet/beholderen bortskaffes til godkendt behandlingsanlæg. Ved luftvejsymptomer: Ring til en GIFTINFORMATION eller en læge. VED INDÅNDING: Ved vejtrækningsbesvær: Flyt personen til et sted med frisk luft og sørg for, at vedkommende hviler i en stilling, som letter vejtrækningen. Anvend åndedrætsværn.

Bortskaffelse

Affaldet indeholder prøver og reagenser. Affaldet kan indeholde toksisk eller smittefarligt materiale og skal bortskaffes på korrekt vis. De korrekte bortskaffelsesprocedurer kan ses i de lokale sikkerhedsbestemmelser.

Se de relevante sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er) for yderligere oplysninger. De findes online i PDF-format på adressen www.qiagen.com/safety, hvor det er muligt at finde, få vist og udskrive SDS'et for hvert QIAGEN-kit og alle kitkomponenter.

Opbevaring og håndtering af reagenser

QIAamp MiniElute-kolonner bør opbevares ved temperaturer på 2-8 °C efter modtagelse, og de kan bruges indtil udløbsdatoen på kittets kasse.

Alle buffere kan opbevares ved stuetemperatur (15 til 25 °C) og er stabile indtil kittets udløbsdato, hvis de er uåbnede.

Stabilitet under brug

Rekonstitueret buffer AW1 og AW2 kan opbevares ved stuetemperatur (15 til 25 °C) i op til 1 år eller indtil kittets udløbsdato, alt efter hvad der indtræffer først.

Prøveopbevaring og -håndtering

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit er udviklet til brug med FFPE-prøver.

DNA-stabilitet afhænger af forskellige faktorer såsom prøvens indsamling, håndtering, klargøring og opbevaringsforhold, der kan påvirke dens anvendelse i efterfølgende anvendelser. Det er vigtigt at konsultere brugsanvisningen for den specifikke efterfølgende anvendelse og/eller verificere og validere hele arbejdsgangen for at etablere passende forhold.

Vedrørende generelle oplysninger om laboratorieprocedurer for indsamling, håndtering, klargøring og opbevaringsbetingelser for FFPE-prøver henvises til ISO 20166-3:2018 "Molekylære in vitro diagnostiske undersøgelser – Specifikationer for præundersøgelsesprocesser for formalinfikseret og paraffinindlejret (FFPE) væv – del 3: Isoleret DNA" og CLSI MM13-A "Indsamling, transport, klargøring og opbevaring af prøver til molekylære metoder; Godkendt retningslinje".

DNA elueres i buffer ATE og er umiddelbart klar til brug i amplifikationsreaktioner eller til opbevaring (betingelser afhængige af brugerkrav). Se de relevante kithåndbøger for anbefalede opbevaringsbetingelser for specifikke efterfølgende QIAGEN-anvendelser.

Procedure

Vigtige anvisninger før start

- Alle medfølgende reagenser i QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit er beregnet til udelukkende at blive brugt sammen med de andre reagenser i det samme QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Hvis der skal opnås optimal ydelse, må reagenserne i kittet ikke udskiftes.
- Når du har modtaget kittet, kontrolleres kittets komponenter for beskadigelse. Hvis pakningerne eller bufferflaskerne er beskadigede, kontaktes QIAGEN Teknisk Service eller den lokale forhandler. I tilfælde af væskespild henvises til "Advarsler og forholdsregler" på side 10). Der må ikke anvendes beskadigede kitkomponenter, eftersom deres anvendelse kan føre til ringe ydelse af kittet.
- Anvend ikke kitkomponenter fra andre kits sammen med det kit, som du i øjeblikket anvender, medmindre lotnumrene er identiske.
- Undgå, at kitreagenserne udsættes for bakteriekontaminering.
- Dette kit bør kun anvendes af personale, der er uddannet i in vitro-diagnostisk laboratoriepraksis.
- Derfor skal der altid bæres latex- eller vinylhandsker, når der arbejdes med reagenser og prøver, for at undgå kontaminering via huden eller fra støvet laboratorieudstyr. Hænder og støvpartikler kan bære bakterier og skimmelsvampe og er dermed hyppige årsager til kontaminering. Skift laboratoriehandskerne hyppigt og hold rørene lukkede.
- Ubrugte buffere, gennemløb og prøverester skal bortskaffes i henhold til lokale procedurer.
- Hvis du bruger dine egne plastikprodukter, anbefales brugen af DNase/RNase-fri lavt bindende, engangspolypropylen 1,5-2 ml koniske rør med tætsluttende låg under hele oprensningsproceduren.
- Udfør alle centrifugeringstrin ved stuetemperatur (15 til 25 °C).
- Alle buffere skal opbevares ved stuetemperatur (15 til 25 °C), og de skal blandes godt før brug.

- Indstil en thermomixer eller en opvarmet orbital inkubator til 56 °C til anvendelse i trin 9. Hvis der ikke er en tilgængelig thermomixer eller opvarmet orbital inkubator, kan der i stedet benyttes en varmeblok eller et vandbad.
- Hvis Buffer AL eller Buffer ATL indeholder bundfald, opløses det ved opvarmning til 70 °C med forsigtig omrøring.
- Kontrollér, at Buffer AW1 og Buffer AW2 er klargjort i henhold til nedenstående instruktioner.
- Kvalitetskontrolprocedurer hos QIAGEN anvender test af funktionel kit-frigivelse for hvert individuelle kit-lot. Derfor må der ikke blandes reagenser fra forskellige kit-lots, og der må ikke kombineres individuelle reagenser fra forskellige reagens-lots.

Klargøring af buffere

Klargøring af buffer ATL

- Før proceduren startes, skal det kontrolleres, om der er dannet bundfald i buffer ATL. Dette opløses om nødvendigt ved opvarmning til 70 °C under forsigtig omrøring.

Klargøring af buffer AL

- Før proceduren startes, skal det kontrolleres, om der er dannet bundfald i Buffer AL. Dette opløses om nødvendigt ved opvarmning til 70 °C under forsigtig omrøring.

Klargøring af buffer AW1

- Tilsæt 25 ml ethanol (96 til 100 %)* til flasken indeholdende 19 ml koncentreret buffer AW1. Markér afkrydsningsfeltet på flaskeetiketten for at angive, at der er blevet tilsat ethanol. Rekonstitueret buffer AW1 kan opbevares ved stuetemperatur (15 til 25 °C) i op til 1 år eller indtil kittets udløbsdato, alt efter hvad der indtræffer først. Vi anbefaler at skrive rekonstitutionsdatoen på bufferens etiket.

Bemærk: Bemærk: Inden proceduren startes, skal det rekonstituerede Buffer AW1 blandes ved at ryste det.

Klargøring af buffer AW2

- Tilsæt 30 ml ethanol (96 til 100 %)* til flasken, der indeholder 13 ml koncentreret buffer AW2. Markér afkrydsningsfeltet på flaskeetiketten for at angive, at der er blevet tilsat ethanol. Rekonstitueret buffer AW2 kan opbevares ved stuetemperatur (15 til 25 °C) i op til 1 år eller indtil kittets udløbsdato, alt efter hvad der indtræffer først. Vi anbefaler at skrive rekonstitutionsdatoen på bufferens etiket.

Bemærk: Inden proceduren startes, skal det rekonstituerede Buffer AW2 blandes ved at ryste det.

Startmateriale

Startmaterialet til DNA-oprensning i sektioner af FFPE-væv (ideelt frisk skåret). Flere sektioner kan kombineres i 1 klarøgøring. Hvis du ikke har oplysninger om dit startmateriales beskaffenhed, anbefaler vi, at du starter med højst 3 sektioner pr. klarøgøring.

* Der må ikke bruges denatureret alkohol, som indeholder andre stoffer, såsom metanol eller methylethylketon.

Brugeren bør optimere antallet af sektioner, snittykkelse og sektionens overfladeareal for alle procedurer, der anvendes i deres laboratorium. Hvis kittet bruges sammen med en efterfølgende QIAGEN-anvendelse, skal du se den relevante håndbog for vejledning.

Håndteringsprocedure for at undgå krydskontaminering

På grund af nukleinsyre-amplifikationsmetodernes høje sensitivitet skal følgende forholdsregler overholdes, når der håndteres QIAamp MiniElute-kolonner for at undgå krydskontaminering mellem prøver:

- Rørene må ikke overfyldes med væv.
- Sørg for at skifte skalpeller mellem prøverne, når vævet skræbes.
- Tilsæt forsigtigt prøven eller opløsningen i QIAamp MinElute-kolonnen. Pipetter prøven i QIAamp MinElute-kolonnen uden at gøre kolonnens kant våd.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. Vi anbefaler, at der anvendes pipettespidser med aerosolskærme.
- Brug altid nye vaskerør ved udførelse af prøvevasketrin.
- Sørg for, at rørenes låg er lukket helt før vortex-blanding og centrifugering.
- Sørg for, at QIAamp MinElute-kolonnen er helt lukket før centrifugering.
- Efter alle trin til puls-vortex-blanding og trin til 90 °C-inkubation centrifugeres mikrocentrifugerørene kortvarigt for at fjerne dråber fra lågenes inderside.
- Åbn kun 1 QIAamp MinElute-kolonne ad gangen, og vær omhyggelig med at undgå aerosol-dannelse.
- Skift altid skalpeller mellem prøverne.
- Udskift altid pipettespidser mellem væskeoverførsler. For at minimere krydskontaminering anbefaler vi anvendelse af pipettespidser med aerosolskærme, og at brugen af multistep-pipetter undgås.
- Brug altid engangshandsker og kontrollér regelmæssigt, om de kan være kontamineret med prøvemateriale. Kassér handsker, hvis du har mistanke om, at de er kontaminede.
- Åbn kun 1 rør ad gangen.

Centrifugering

QIAamp MinElute-kolonner passer ind i de fleste almindelige 1,5-2 ml mikrocentrifuger. Centrifugering af QIAamp MinElute-kolonner udføres ved ca. 6000 x g for at reducere centrifugestøj. Centrifugering ved fuld hastighed vil ikke forbedre DNA-udbyttet. Imidlertid kræves centrifugering af QIAamp MinElute-kolonner ved fuld hastighed i 2 trin af proceduren: Tørcentrifugeringstrinnet efter membranerne er vasket og elueringsstrinnet. Centrifugering ved fuld hastighed er også påkrævet til at få prøven ned efter xylenebehandlingen og ethanolvasketrinnet.

Alle centrifugeringstrin skal udføres ved stuetemperatur (15–25 °C). Lav centrifugeringstemperatur kan føre til suboptimal ekstrahering.

Behandling af QIAamp MinElute-kolonner i en mikrocentrifuge

- Luk altid QIAamp MinElute-kolonner, før de placeres i mikrocentrifugen.
- Undgå at røre ved QIAamp MinElute-kolonns membran med pipettespidsen.
- Gennemløbsfraktioner kan indeholde farligt affald og skal bortskaffes behørigt.
- For effektiv parallelbehandling af flere prøver på én gang anbefaler vi at fylde et rack med vaskerør, hvortil QIAamp MinElute-kolonnerne kan overføres efter centrifugeringen. Brugte vaskerør med gennemløb kan bortskaffes og de nye vaskerør med QIAamp MinElute-kolonner kan anbringes direkte i mikrocentrifugen.
- Sørg for, at der bevares fuld prøvesporbarhed under hele processen.

Eluering af oprenset DNA

Ved efterfølgende anvendelser, der kræver små startvolumener (f.eks. nogle PCR-analyser), kan et mere koncentreret eluat øge analysefølsomheden, men kan også resultere i en stigning i koncentrationen af potentielle hæmmere.

En øgning i elueringsmængden vil nedsætte koncentrationen af DNA i eluatet.

Mængden af udvundet eluat kan være ca. 5 µL mindre end mængden af Buffer ATE påført QIAamp MinElute-kolonnen. For eksempel resulterer en elueringsmængde på 20 µL i ≥ 15 µL eluat. Mængden af udvundet eluat afhænger af prøvens beskaffenhed.

Det er brugerens ansvar at optimere elueringsmængden for alle procedurer, der anvendes i deres laboratorium. Se kithåndbøgerne for anbefalede elueringsmængder, der kræves til specifikke efterfølgende QIAGEN-anvendelser.

Udbyttet kan øges, hvis kolonnen inkuberes med buffer ATE ved stuetemperatur i f.eks. 5 minutter før centrifugering. Elueret DNA kan opsamles i 1,5 ml elueringsrørene (medfølger). Opbevaringsbetingelser for det eluerede DNA afhænger af brugerdefinerede krav. Se kithåndbøgerne for anbefalede opbevaringsbetingelser for specifikke efterfølgende QIAGEN-anvendelser.

Protokol: Isolering af genomisk DNA fra FFPE-vævssnit

Procedure

1. Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken.
2. Skær snit i henhold til almindelig laboratoriepraksis (se "Startmateriale", side 17). Brugeren bør optimere antallet af sektioner, snittykkelse og sektionens overfladeareal for alle procedurer, der anvendes i deres laboratorium. Sørg for, at sporbarheden af prøverne bevares under hele proceduren.
3. Skrab straks vævet fra snittene ved hjælp af en steril skalpel i et lysisrør (medfølger). Sørg for, at alt det tilgængelige væv placeres i røret. Tilsæt 1 ml xylen til prøven, luk låget, og vortex-bland kraftigt, indtil paraffinen opløses (f.eks. 10 sekunder). Sørg for, at røret er helt lukket for at undgå spild af xylen, krydskontaminering mellem prøver og mulig kontakt med xylen.
Bemærk: Brug xylen i stinkskebe eller andet passende indeslutningsapparat.
4. Centrifuger ved fuld hastighed i ca. 2 minutter ved stuetemperatur for at opsamle vævspellet. Hvis der ikke blev dannet vævspellet, skal dette trin gentages.
Bemærk: Lav centrifugeringstemperatur kan føre til suboptimal ekstrahering.
5. Fjern og kassér supernatanten ved pipettering. Bevar pelleten.
Supernatanten indeholder xylen, som er farligt affald og skal bortskaffes korrekt i henhold til lokale regler.
6. Tilsæt 1 ml ethanol (96 til 100 %) til vævspelleten og bland grundigt ved vortex-blanding.
Ethanolet ekstraherer resterende xylen fra prøven og skal bortskaffes behørigt.
7. Centrifuger ved fuld hastighed i ca. 2 minutter ved stuetemperatur.
Fjern forsigtigt supernatanten ved pipettering. Pelleateringen må ikke fjernes.

Fjern forsigtigt eventuel resterende ethanol vha. en fin pipettespids. Åbn røret og inkuber ved 15 til 40 °C, indtil al resterende ethanol er fordampet. Fjernelse af resterende ethanol er af afgørende betydning for ekstraheringens resultat.

Bemærk: Lavere inkubationstemperatur forsinket fordampningstiden, mens højere temperatur kan overtørre pelleten, hvilket gør det vanskeligt at suspendere.

8. Resuspendér pelleten i 180 µl Buffer ATL. Tilsæt 20 µl Proteinase K, og bland ved vortex-blanding.

Bemærk: Pellet skal resuspenderes godt i ATL-buffere for at sikre det maksimale udbytte af udvindingen.

9. Inkubér ved 56 °C i ca. 1 time (indtil prøven er blevet fuldstændig lyseret).

10. Inkubér ved 90 °C i 1 time.

Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvist formaldehydmodifikationen af nukleinsyrer. Kortere inkubationstider eller lavere inkubationstemperaturer kan påvirke DNA-kvalitet og -mængde. Hvis der kun anvendes 1 varmekontrol, skal prøven forblive ved stuetemperatur efter 56 °C inkubering, indtil varmekontrolen har nået 90 °C.

11. Centrifuger røret kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.

12. Tilsæt 200 µl Buffer AL til prøven, og bland grundigt ved vortex-blanding. Tilsæt derefter 200 µl ethanol (96 til 100 %), og bland igen grundigt ved vortex-blanding.

Det er vigtigt, at prøve, Buffer AL og ethanol blandes omgående og grundigt ved blanding i vortexer eller ved pipettering for at give en homogen opløsning. Buffer AL og ethanol kan forblendes og tilsættes sammen i 1 trin for at spare tid ved behandling af flere prøver.

Der kan dannes et hvidt bundfald ved tilsætning af Buffer AL og ethanol. Dette bundfald påvirker ikke QIAamp-proceduren. Brug altid frisk blanding og kassér den straks efter brug.

13. Centrifuger røret kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.

14. Overfør forsigtigt hele lysatet til QIAamp MinElute-kolonnen (i et 2 ml vaskerør) uden at gøre kanten våd. Luk låget og centrifuger ved 6000 x g i ≥1 minut. Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (medfølger), og bortskaf vaskerøret med gennembløbet.

Hvis lysatet ikke er kommet helt gennem membranen efter centrifugering, skal der centrifugeres igen ved en højere hastighed, indtil QIAamp MinElute-kolonnen er tom.

15. Åbn forsigtig QIAamp MinElute-kolonnen, og tilsæt 500 µl rekonstitueret Buffer AW1 uden at gøre kanten våd. Luk låget, og centrifugér ved ca. 6000 x g i ≥ 1 minut. Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør, og bortskaf vaskerøret med gennembløbet.
16. Åbn forsigtig QIAamp MinElute-kolonnen, og tilsæt 500 µl rekonstitueret Buffer AW2 uden at gøre kanten våd. Luk låget, og centrifugér ved ca. 6000 x g i ≥ 1 minut. Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør, og bortskaf vaskerøret med gennembløbet.

Kontakt mellem QIAamp MinElute-kolonnen, og gennembløbet skal undgås. Sørg for at afbalancere centrifugerotoren. Nogle centrifugerotorer kan vibrere ved deceleration, hvilket resulterer i, at gennembløbet, der indeholder ethanol, kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen. Udvis forsigtighed ved udtagning af QIAamp MinElute-kolonnen og vaskerøret fra rotoren, så gennembløbet ikke kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen.

17. Centrifugér ved fuld hastighed (ca. 20.000 x g) i ca. 3 minutter for at tørre membranen. Ethanoloverførsel til eluatet kan interferere med nogle efterfølgende anvendelser.
18. Anbring QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 1,5 ml elueringsrør (medfølger), og bortskaf vaskerøret med gennembløbet. Åbn forsigtigt låget på QIAamp MinElute-kolonnen, og tilsæt 20-200 µl Buffer ATE til midten af membranen.

Vigtigt! Ved brug af små elueringsmængder (<50 µL) skal der dispenseres buffer ATE til midten af membranen for at sikre fuldstændig eluering af bundet DNA. QIAamp MinElute-kolonnerne giver fleksibilitet i valget af elueringsmængde. Vælg en mængde i overensstemmelse med kravene i den efterfølgende anvendelse. Mængden af eluat vil være ca. 5 µL mindre end mængden af elueringsopløsning påført kolonnen.

19. Luk låget og inkuber ved stuetemperatur (15 til 25 °C) i mindst 1 minut. Centrifugér ved fuld hastighed (ca. 20.000 x g) i ≥ 1 minut.

Inkubering af QIAamp MinElute-kolonnen fyldt med Buffer ATE i ca. 5 minutter ved stuetemperatur før centrifugering kan øge DNA-udbyttet.

Kvalitetskontrol

I overensstemmelse med QIAGENs ISO-certificerede kvalitetsstyringssystem testes hvert lot af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits efter fastlagte specifikationer for at sikre en ensartet produktkvalitet.

Begrænsninger

Kittets ydelse er blevet fastlagt ved hjælp af FFPE-væv til isolering af genomisk DNA.

Under- eller overfiksering kan påvirke DNA-kvaliteten, hvilket resulterer i dårlig ydelse i efterfølgende analyser.

Dehydrér grundigt prøverne før indlejring, da restformalin kan hæmme opløsningstrinnet ved Proteinase K.

Det er brugerens ansvar at kontrollere systemets egnethed til eventuelle procedurer, der udføres i laboratoriet og ikke er omfattet af QIAGENs ydelsesundersøgelser.

For at minimere risikoen for en negativ indvirkning på diagnostiske resultater skal der anvendes hensigtsmæssige kontroller for efterfølgende anvendelser. For yderligere validering anbefales retningslinjerne i International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) i *ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text and Methodology* anbefales.

De fremkomne diagnostiske resultater skal fortolkes i forbindelse med andre kliniske fund eller laboratoriefund.

Ved hjælp af QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan RNA oprenses sammen med DNA'et, hvis det er til stede i prøven.

Ydelseskarakteristik

Du finder de relevante ydelseskarakteristik på fanen Resource (Ressourcer) på produktsiden på www.qiagen.com.

Fejlfindingsvejledning

Denne fejlfindingsvejledning kan være nyttig til at afhjælpe eventuelle problemer. Yderligere information kan også fås på siden med ofte stillede spørgsmål (Frequently Asked Questions, FAQ) hos vores center for teknisk support: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Derudover svarer personalet fra QIAGEN Teknisk Service gerne på spørgsmål vedrørende enten informationen og/eller protokollerne i denne håndbog eller prøve- og analyseteknologier (kontaktinformation: Besøg www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Tilstoppede QIAamp MinElute-kolonner

- | | |
|---|---|
| a) For meget startmateriale | Reducer mængden af startmateriale. Det er vigtigt at bruge den korrekte mængde startmateriale (se side 17). |
| b) Centrifugeringstemperaturen er for lav | Centrifugeringstemperaturen skal være 15 til 25 °C. Nogle centrifuger kan køle længere ned end 15 °C, selv når de er indstillet til 20 °C. Dette kan forårsage dannelse af bundfald, der kan tilstoppe QIAamp MinElute-kolonnerne. Hvis dette sker, skal du indstille centrifugeringstemperaturen til 15-25 °C. |

Lavt DNA-udbytte

- | | |
|---|---|
| a) For meget startmateriale | Overbelastning af QIAamp MinElute-spinkolonne reducerer nukleinsyreudbyttet markant. Reducer mængden af startmateriale (se side 17). |
| b) DNA stadig bundet til RNeasy MinElute-spinkolonnemembran | Gentag DNA-eluering, men inkuber QIAamp MinElute-spinkolonne på bordet i 10 minutter med ATE-buffer (elueringbuffer) før centrifugering. |
| c) Forkert opbevaring af buffere/reagenser | QIAamp MinElute-spinkolonnerne skal opbevares ved 2 til 8 °C ved modtagelsen af kittet. Kontrollér den korrekte opbevaringstemperatur, da udsættelse for højere temperaturer i længere perioder kan føre til tab af funktionalitet. |

Lav A_{260}/A_{280} værdi

- | | |
|---|---|
| Vand brugt til at fortynde nukleinsyre til A_{260}/A_{280} måling | Brug 10 mM Tris Cl, pH 7,5, ikke vand, til at fortynde prøven før måling af renhed. |
|---|---|












DNA opfører sig ikke korrekt i efterfølgende analyser/anvendelser

Ethanoloverførsel

Centrifugering af QIAamp MinElute-kolonner ved fuld hastighed er påkrævet i 2 trin af proceduren: Under den anden vask med Buffer AW2 skal du sørge for at centrifugere ved $\geq 8.000 \times g$ i 2 minutter ved 15 til 25 °C for at tørre QIAamp MinElute-kolonnemembranen. Efter centrifugering fjernes kolonnen forsigtigt fra indsamlingsrøret, så kolonnen ikke har kontakt med gennemløbet. Anbring derefter kolonnen i et nyt prøvetagningsrør, og centrifuger ved fuld hastighed i 5 minutter. Centrifugering ved fuld hastighed er også påkrævet til at få prøven ned efter xylenebehandlingen og ethanolvasketrinnet.

Symboler

Følgende symboler vises muligvis i brugsanvisningen eller på emballagen og etiketten:

Symbol	Symboldefinition
 Σ <N>	Indeholder tilstrækkeligt med reagenser til <N>-reaktioner
	Holdbarhedsdato
	Dette produkt opfylder kravene i EU-direktivet 2017/746 for medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik.
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialenummer (dvs. etiketten på komponenten)
	Komponenter
	Indeholder
	Antal
	Globalt handelsvarenummer

Symbol	Symboldefinition
Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Temperaturbegrænsning
	Producent
	Læs brugervejledningen
	Opbevares uden for sollys
	Advarsel/forsigtig
	Proteinase K
	Natriumazid
	Ved levering
	Skriv den aktuelle dato ned efter tilsætning af ethanol i flasken
	Ethanol

Symbol	Symboldefinition
ADD	Tilsætter
GuHCl	Guanidinhydrochlorid
MALEIC ACID	Maleinsyre
UDI	Entydig instrumentidentifikator

Appendiks: Behandling

Generel håndtering

Derfor skal der altid bæres latex- eller vinylhandsker, når der arbejdes med reagenser og prøver, for at undgå kontaminering via huden eller fra støvet laboratorieudstyr. Hænder og støvpartikler kan bære bakterier og skimmelsvampe og er dermed hyppige årsager til kontaminering. Skift laboratoriehandskerne hyppigt og hold rørene lukkede. Undgå, at kitreagenserne udsættes for bakteriekontaminering.

Plastartikler engangsbrug

Det anbefales at bruge sterile, engangspolypropylenrør under hele proceduren.

Bestillingsinformation

Produkt	Indhold	Kat.-nr.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – til oprensning af genomisk DNA fra paraffinindstøbt væv		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargøringer: 50 QIAamp MinElute-kolonner, Proteinase K, buffere, vaskerør (2 ml), elueringsrør (1,5 ml), lysisrør (2 ml)	60404

Opdaterede licensoplysninger og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser kan ses i brugsanvisningen til det aktuelle QIAGEN-kit. QIAGEN kit-brugsanvisninger kan fås via www.qiagen.com eller kan rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale forhandler.

Revisionshistorik for dokumentet

Revision	Beskrivelse
R1, juni 2022	<ul style="list-style-type: none">● Opdatering til kit-version 2 for overholdelse af IVDR● Opdatering af afsnittet Beskrivelse og princip● Opdatering af afsnittet Nødvendige materialer, som ikke medfølger● Opdatering af afsnittet Advarsler og forholdsregler● Opdatering af afsnittet Opbevaring og håndtering af reagenser● Opdatering af afsnittet Fejlfindingsvejledning● Opdatering af Tillæg
R2, februar 2023	<ul style="list-style-type: none">● Opdatering af afsnittet Prøveopbevaring og -håndtering

Begrænset licensaftale for QIAamp DSP DNA Kit

Brug af dette produkt betyder, at enhver køber eller bruger af produktet accepterer følgende vilkår:

1. Produktet må kun anvendes i overensstemmelse med protokoller leveret med produktet og denne håndbog og kun med de komponenter, der er i panelet. QIAGEN giver ingen licens, under nogen intellektuel ejendomsret, til at bruge eller inkludere komponenterne i dette panel med komponenter, der ikke er inkluderet i dette panel, undtagen som beskrevet i de protokoller, der følger med produktet, denne håndbog og andre protokoller, der er tilgængelige på www.qiagen.com. Nogle af disse andre protokoller er stillet til rådighed af QIAGEN-brugere for QIAGEN-brugere. Disse protokoller er ikke grundigt testet eller optimeret af QIAGEN. QIAGEN hverken garanterer for dem eller for, at de ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
2. Ud over de udtrykkeligt givne licenser giver QIAGEN ingen garanti for, at dette panel, og/eller brugen af det, ikke overtræder tredjeparts rettigheder.
3. Dette panel og dets komponenter er under licens til engangsbrug og må ikke genbruges, genoprettes eller videresælges.
4. QIAGEN afviser specifikt alle andre licenser, udtrykte eller underforståede, end dem, der udtrykkeligt er angivet.
5. Køberen og brugeren af panelet indvilliger i ikke at tage, eller lade andre tage, skridt der kunne føre til, eller fremme, handlinger der forbydes ovenfor. QIAGEN kan håndhæve forbuddene i denne begrænsede licensaftale ved enhver domstol og vil inddrive alle undersøgelses- og sagsomkostninger, herunder advokatsalærer, i ethvert søgsmål for at håndhæve denne begrænsede licensaftale samt alle deres intellektuelle ejendomsrettigheder i forbindelse med panelet og/eller komponenterne deri.

Opdaterede licensbetingelser kan findes på www.qiagen.com.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.).

Feb-2023 HB-3033-002 1130780DA © 2023 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

