

Bruksanvisning (håndbok) for RNeasy[®] DSP FFPE Kit



Versjon 2

IVD

Til in vitro-diagnostisk bruk

Til bruk sammen med RNeasy DSP FFPE Kit

CE

REF

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1 **MAT**

1127532NO

Innhold

Tiltent bruk	4
Tiltent bruker.....	4
Beskrivelse og prinsipp.....	5
Oppsummering og forklaring	5
Prosedyreprinsipper	6
Materialer som medfølger.....	8
Settets innhold.....	8
Komponenter i settet	9
Nødvendige materialer som ikke følger med.....	10
Advarsler og forholdsregler.....	11
Sikkerhetsinformasjon	11
Informasjon ved nødstilfeller	12
Forsiktighetsregler.....	12
Håndtering og oppbevaring av reagenser	14
Stabilitet under bruk.....	14
Settkomponenter.....	14
Prosedyre	15
Viktige punkter før du starter	15
Klargjøring av buffere.....	16
Ting du må gjøre før du starter.....	17
Protokoll: Rensing av totalt RNA fra FFPE-vevssnitt	18
Kvalitetskontroll	22

Begrensninger	22
Ytelseegenskaper	23
Avfallshåndtering.....	24
Feilsøkningsveiledning	25
Symboler	28
Kontaktinformasjon	30
Vedlegg: Generelle kommentarer om håndtering av RNA.....	31
Bestillingsinformasjon	33
Revisjonshistorikk for dokument	34

Tiltenkt bruk

RNeasy DSP FFPE Kit er et system for manuell rensing av totalt RNA fra formalinfikserte, parafininnstøpte (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded FFPE) vev.

Det benytter en optimalisert silika-spinnkolonnebasert protokoll og inkluderer enzymatisk fjerning av rest-DNA.

RNeasy DSP FFPE Kit er beregnet på bruk i in vitro-diagnostikk.

Tiltenkt bruker

Produktet er beregnet for bruk av profesjonelle brukere, for eksempel teknikere og leger som har fått opplæring i molekylærbiologiske teknikker.

Beskrivelse og prinsipp

Oppsummering og forklaring

RNeasy DSP FFPE Kit er spesielt utviklet for rensing av totalt RNA fra FFPE-vevssnitt. Ved å isolere RNA-molekyler som er lengre enn 70 nukleotider, gir settet gjenfinning av anvendelige RNA-fragmenter for applikasjoner som RT-PCR.

På grunn av fikserings- og innstøpningsforholdene blir nukleinsyrer i FFPE-prøver vanligvis fragmentert og kjemisk modifisert av formaldehyd. Nukleinsyrer isolert fra FFPE-prøver har derfor vanligvis lavere molekylvekt enn de fra ferske eller frosne prøver. Graden av fragmentering er avhengig av type og alder på prøven og på betingelsene som brukes for fiksering, innstøpning og oppbevaring av prøven. For standardisering av forundersøkelser for FFPE-vev anbefaler vi å gå frem som i ISO 20166-1:2018 «Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 1: Isolated RNA».

Selv om formaldehydmodifisering ikke kan påvises i standard kvalitetskontrollanalyser, som gelelektroforese eller lab-på-brikke-analyse, viser den sterk interferens med enzymatiske analyser.

Selv om RNeasy DSP FFPE Kit er optimalisert for å reversere så mye formaldehydmodifisering som mulig uten ytterligere RNA-nedbrytning, bør nukleinsyrer rensset fra FFPE-prøver ikke brukes i nedstrømsapplikasjoner som krever RNA med full lengde. Noen applikasjoner kan kreve modifikasjoner for å tillate bruk av fragmentert RNA (f.eks. utforming av små amplikoner for RT-PCR). Til cDNA-syntese bør det brukes enten tilfeldige eller genspesifikke primere i stedet for oligo-dT-primere.

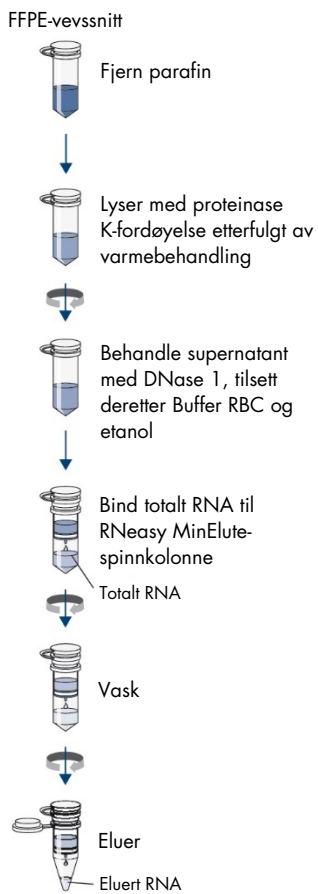
Farging av FFPE-snitt kan også forringe RNA-kvaliteten og ytelsen i nedstrømsapplikasjoner. Dette gjelder spesielt for mange protokoller for immunhistokjemisk farging.

Prosedyreprinsipper

RNeasy DSP FFPE-prosedyren bruker den veletablerte RNeasy-teknologien for RNA-rensing. Spesielt optimaliserte lyseringsbetingelser gjør det mulig å rense totalt RNA effektivt fra FFPE-vevssnitt. DNase I-fordøyelsestrinnet fjerner effektivt DNA-kontaminering, inkludert svært fragmenterte molekyler.

Først fjernes all parafin fra FFPE-vevsnittene ved å behandle dem med Deparaffinization Solution. Deretter inkuberes prøvene i en optimalisert lyseringsbuffer som inneholder proteinase K, for å frigjøre RNA fra snittene. En kort inkubering ved høyere temperatur reverserer delvis formalintverbindingen av de frigjorte nukleinsyrene, noe som forbedrer RNA-utbyttet og -kvaliteten, samt RNA-ytelsen i enzymatiske nedstrømsanalyser. Deretter følger DNase I-behandling som er optimalisert for å eliminere genomisk DNA, inkludert svært små DNA-fragmenter som ofte finnes i FFPE-prøver etter langvarig formalinfiksering og/eller lang oppbevaringstid. Deretter blandes lysatet med Buffer RBC. Etanol tilsettes for å gi passende bindingsbetingelser for RNA, og prøven overføres deretter til en RNeasy MinElute-spinnkolonne, der totalt RNA bindes til membranen og kontaminanter vaskes effektivt bort. RNA elueres deretter i minst 14 µl RNase-fritt vann.

RNeasy DSP FFPE-prosedyre



Figur 1. Prosedyre for RNA-rensing fra FFPE-vev ved bruk av RNeasy DSP FFPE Kit.

Materialer som medfølger

Settets innhold

RNeasy DSP FFPE Kit	(50)
Katalognr.	73604
Antall klargjøringer	50

	ID	Symboler	Antall
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (Spinnkolonner) (rosa) (hver i et 2 ml prøvetakingsrør)	COL	50
ET	Elution Tubes (Elusjonrør) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Lyseringsrør) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Vaskerør) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution (Deparaffineringsløsning)	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (RNase-fritt Dnase I) (lyofilisert)	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (RNase-fritt vann)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE† (konsentrat)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v2	Håndbok for RNeasy DSP FFPE Kit		1

* Inneholder et guanadinsalt. Ikke kompatibel med desinfeksjonsmidler som inneholder blekemiddel. Se side 11 for sikkerhetsinformasjon.

† Før den brukes første gang, skal 4 volumer etanol (96–100 %, ikke denaturert) tilsettes, som angitt på flasken, og beskrevet på side 16 for å få en aktiv løsning.

Komponenter i settet

Settets hovedkomponenter blir beskrevet nedenfor.

Tabell 1. Medfølgende reagenser som inneholder aktive ingredienser

Reagens		Komponenter	Volum
Symbol	Navn		
DPS	Deparaffinization Solution	Heksadekan	≥ 90 % til ≤ 100 % vekt/vekt
RBC	Buffer RBC	Guanidinhidroklorid	≥ 30 % til 70 % vekt/vekt
PKD	Buffer PKD	Ingen	–
PK	Proteinase K	Proteinase K	≥ 1 % til < 3 % vekt/vekt
DN	RNase-fritt Dnase I (lyofilisert)	DNase	≥ 90 % til ≤ 100 % vekt/vekt
RNFW	RNase-fritt vann	Ingen	–
DBB	DNase Booster Buffer	Ingen	–
RPE	Buffer RPE (konsentrat)	Ingen	–

For å redusere risikoen for negativ innvirkning på diagnostiske resultater som er generert etter RNA-isolering, skal det brukes egnede kontroller for nedstrømsapplikasjoner.

Nødvendige materialer som ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Du finner mer informasjon på de aktuelle sikkerhetsdatabladene (HMS-databladene) som fås fra leverandøren av produktet.

Se til at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

- sterile, RNase-frie pipettespisser og pipetter
- mikrosentrifuge (med rotor for 2 ml rør)
- vorteksblender
- 96–100 % etanol (ikke bruk denaturert alkohol, som inneholder andre stoffer slik som metanol eller metyletylketon)
- engangshansker
- varmeblokk med ristefunksjon som kan inkubere ved 56 °C og 80 °C

Advarsler og forholdsregler

Vær oppmerksom på at alvorlige hendelser i forbindelse med bruken av utstyret muligens må rapporteres til produsenten og den ansvarlige myndigheten i det landet hvor brukeren og/eller pasienten befinner seg.


Alle tiltenkte risikoreduserende tiltak ble implementert når mulig på dette stadiet av produktutviklingen, og de ble systematisk gjennomgått. Basert på risikostyring anses den totale restrisikoen som akseptabel, og bruken av enheten vurderes som trygg. Det er ingen restrisiko for RNeasy DSP FFPE Kit.

Til in vitro-diagnostisk bruk.

Les alle instruksjonene nøye før du bruker settet.

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige på nett i PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatablader for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

	ADVARSEL Risiko for personskader
	IKKE tilsett blekemidler eller sure løsninger direkte i prøveklargjøringsavfallet.

Bufrene i RNeasy DSP FFPE Kit inneholder natriumazid. Dersom buffere fra settet blir sølt ut, må du rengjøre med egnet laboratorievaskemiddel og vann. Dersom den utsølte væsken inneholder potensielt smittsomme stoffer, rengjør det berørte området først med laboratorievaskemiddel og vann, og deretter med 1 % (volum/volum) natriumhypoklorittløsning.

Informasjon ved nødstilfeller

CHEMTREC

USA og Canada 1-800-424-9300

Utenfor USA og Canada +1 703-527-3887

Forsiktighetsregler

Følgende fare- og risikosegninger og forholdsregler gjelder komponentene i RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNF, DBB

Inneholder: Natriumazid. Advarsel! Kan være skadelig ved svelging. Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege hvis du føler deg uvel.

Deparaffinization Solution



Inneholder: heksadekan. Fare! Kan være dødelig ved svelging om det kommer ned i luftveiene. Irriterer huden. Forårsaker alvorlig øyeirritasjon. Kan føre til irriterte luftveier. Kan forårsake skadelige langtidsvirkninger for liv i vann. Benytt vernehansker/vernekler/vernebriller/ansiktsskjerm. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta umiddelbart kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege. IKKE framkall brekninger. Oppbevares innelåst. Innhold/holder leveres til et godkjent avfallsbehandlingssted.

Proteinase K



Inneholder: Proteinase K. Fare! Forårsaker mild hudirritasjon. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler. Benytt vernehansker/vernekler/vernebriller/ansiktsskjerm. Bruk åndedrettsvern. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege. Flytt personen til frisk luft, og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Innhold/holder leveres til et godkjent avfallsbehandlingssted.

DNase I



Inneholder: DNase. Fare! Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Unngå innånding av støv/røyk/gass/tåke/damp/aerosoler. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. Bruk åndedrettsvern. Ved eksponering eller mistanke om eksponering: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege. Flytt personen til frisk luft, og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet.

Buffer RBC



Inneholder: guanidinhydroklorid. Advarsel! Farlig ved svelging eller innånding. Irriterer huden. Forårsaker alvorlig øyeirritasjon. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

DNase Booster Buffer



Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

Håndtering og oppbevaring av reagenser

RNase-fritt DNase I og RNeasy MinElute-spinnkolonner skal oppbevares ved 2–8 °C umiddelbart etter mottak. Bufrene kan oppbevares ved romtemperatur (15–25 °C). Under disse forholdene kan settet oppbevares til utløpsdatoen som er angitt på etiketten på esken, uten at ytelsen reduseres.

Ikke bruk RNeasy DSP FFPE Kit etter utløpsdatoen.

Stabilitet under bruk

Settet kan brukes i 10 måneder etter første bruk eller til utløpsdatoen.

Settkomponenter

Utløpsdatoer for hvert reagens er angitt på de enkelte komponentenes etiketter. Under korrekte oppbevaringsforhold vil produktet opprettholde ytelsen i stabilitetstiden så lenge man bruker de samme partiene med komponenter.

For langtidslagring av DNase I etter rekonstituering tas arbeidsløsningen ut av hetteglasset, deles opp i alikvoter til engangsbruk og oppbevares ved –15 til –30 °C i opptil 10 måneder. Tinte alikvoter kan oppbevares ved 2–8 °C i opptil 8 uker. Ikke frys alikvotene på nytt etter tining.

Unngå at reagensene eksponeres for UV-lys (f.eks. brukt til dekontaminering), siden eksponering kan fremskynde aldringen.

Prosedyre

Viktige punkter før du starter

Startmateriale

Standard prosedyrer for formalinfiksering og parafininnstøpning fører alltid til signifikant fragmentering og tverrbinding av nukleinsyrer. Sørg for følgende for å begrense omfanget av fragmentering og tverrbinding av nukleinsyrer:

- Bruk vevsprøver som er mindre enn 5 mm tykke, slik at formalinet kan trenge helt inn.
- Fikser vevsprøver i 4–10 % nøytral bufret formalin så hurtig som mulig etter kirurgisk fjerning.
- Bruk en maksimal fikseringstid på 24 timer (lengre fikseringstider fører til mer alvorlig fragmentering av nukleinsyrer, noe som fører til dårlig ytelse i nedstrømsanalyser).
- Tørk prøvene grundig før innstøpning.
- Bruk lavsmeltende parafin til innstøpning.

Utgangsmaterialet for RNA-rensing bør være snitt av FFPE-vev med en tykkelse på opptil 20 μm . Tykkere snitt kan resultere i lavere nukleinsyreutbytter, selv etter langvarig inkubering med proteinase K. Opptil 4 snitt, hvert med en tykkelse på opptil 10 μm , kan kombineres i ett preparat. Flere enn 4 snitt kan kombineres hvis den totale summen av tykkelsen på snittene er 40 μm eller mindre (f.eks. åtte 5 μm tykke snitt).

For vev med spesielt høyt DNA-innhold anbefaler vi å bruke færre snitt per preparat for å unngå DNA-kontaminering av det rensede RNA-et.

Hvis det ikke er noen informasjon om typen startmateriale, anbefaler vi å starte med maksimalt 2 snitt per klargjøring. Avhengig av RNA-utbytte og renhet kan det være mulig å bruke inntil 4 snitt i etterfølgende klargjøring. Overbelastning av RNeasy MinElute-spinnkolonne kan imidlertid redusere RNA-utbyttet og -kvaliteten signifikant.

Klargjøring av buffere

Klargjøring av DNase I-arbeidsløsning

Klargjør DNase I-arbeidsløsning ved å løse opp lyofilisert DNase I i 550 µl RNase-fritt vann. Ikke åpne hetteglasset, da det kan føre til tap av DNase I. Injisjer RNase-fritt vann i hetteglasset ved hjelp av en RNase-fri nål og sprøyte. Bland forsiktig ved å vende hetteglasset. Ikke bruk vorteksblender.

I noen tilfeller kan hetteglasset med DNase I se ut til å være tomt. Dette skyldes at frysetørket enzym fester seg til septum. Ikke åpne hetteglasset, da det kan føre til tap av DNase I. Løs i stedet opp DNase I med nål og sprøyte som beskrevet nedenfor.

Merk: DNase I er spesielt følsomt for fysisk denaturering. Blanding skal kun utføres ved å vende flasken forsiktig opp og ned.

Merk: Pass på at hele volumet med RNase-fritt vann injiseres i hetteglasset.

Det kan være uoppløselig materiale igjen etter oppløsning av DNase I. På grunn av produksjonsprosessen kan det være uoppløselig materiale i lyofilisert DNase I. Dette påvirker ikke ytelsen til DNase I.

For langtidsoppbevaring av DNase I: Ta arbeidsløsningen ut av hetteglasset, del den opp i alikvoter til engangsbruk, og oppbevar ved -15 til -30 °C i opptil 10 måneder. Tinte alikvoter kan oppbevares ved $2-8$ °C i opptil 8 uker. Ikke frys alikvotene på nytt etter tining.

Klargjøring av Buffer RPE

Tilsett 4 volumer (44 ml) etanol (96–100 %) i flasken som inneholder 11 ml med Buffer RPE-konsentrat. Merk av avkrysningsboksen på flaskeetiketten for å indikere at det er tilsatt etanol.

Merk: Før prosedyren starter, må du blande rekonstituert Buffer RPE ved å riste den.

Ting du må gjøre før du starter

- Hvis du bruker RNeasy DSP FFPE Kit for første gang, må du lese «Viktige punkter før du starter» (side 15)
- Hvis det er første gang du arbeider med RNA, må du lese «Vedlegg: Generelle kommentarer om håndtering av RNA» (side 30).
- RBC-buffer inneholder et guanidinsalt og er derfor ikke kompatibel med desinfeksjonsmidler som inneholder blekemiddel. Se side 11 for sikkerhetsinformasjon.
- Med mindre annet er angitt utfører du alle trinnene i prosedyren ved romtemperatur (15–25 °C). Det er viktig å arbeide raskt under denne prosedyren og ikke ta pauser.
- Utfør alle sentrifugeringstrinn ved hjelp av en mikrosentrifuge ved 15–25 °C. Hvis du bruker en nedkjølt mikrosentrifuge, setter du temperaturen til 20–25 °C, ellers kan det oppstå signifikant nedkjøling til under 15 °C.
- I fremgangsmåten nedenfor angir ▲ volumene som skal brukes ved behandling av 1–2 snitt per prøve, mens ● angir volumene som skal brukes ved behandling av 3–4 snitt per prøve.
- Hvis du bruker Buffer RPE og RNase-fri DNase I for første gang, rekonstituerer du dem som beskrevet i «Klargjøring av buffere» (side 16).
- Stabiliser alle buffere til romtemperatur (15–25 °C). Bland rekonstituert Buffer RPE ved å riste.
- Still inn en termoblander på 56 °C for bruk i trinn 5 og 9. For å redusere ventetiden kan du stille inn en ekstra termoblander på 80 °C til bruk i trinn 9.

- Merk: Ikke avbryt rensingsprosedyren underveis, da økt inkubasjonstid kan føre til tap eller nedbrytning av RNA. Gjennomsnittlig behandlingstid for opptil 12 prøver parallelt er ca. 130 minutter.

Protokoll: Rensing av totalt RNA fra FFPE-vevssnitt

1. Trim av overflødig parafin fra prøveblokken med en skalpell.
2. Skjær 5–20 µm tykke snitt.
Hvis prøveoverflaten er blitt utsatt for luft, kast de første 2–3 snittene.
3. Plasser snittene umiddelbart i et ▲ 1,5 ml eller ● 2 ml mikrosentrifugerør, og lukk lokket.
4. Tilsett ▲ 160 eller ■ 320 µl Deparaffinization Solution, bland kraftig i vorteksblender i 10 sekunder, og sentrifuger kort for å få prøven til bunnen av røret.
5. Inkuber ved 56 °C i 3 minutter, og avkjøl deretter i 5 minutter ved romtemperatur.
Hvis det brukes for lite Deparaffinization Solution, eller hvis for mye parafin følger med prøven, kan Deparaffinization Solution bli voksaktig eller fast etter avkjøling. Hvis dette skjer, tilsetter du mer Deparaffinization Solution i trinn på 160 µl og gjentar trinn 5.
6. Tilsett ▲ 150 eller ● 240 µl Buffer PKD, og bland i 3 sekunder ved hjelp av vorteksblending.
7. Sentrifuger i 1 minutt ved 11 000 x g.
8. Tilsett 10 µl proteinase K i den nedre, klare fasen, og bland ved å pipettere forsiktig 10 ganger opp og ned (ikke bland separerte faser).
9. Inkuber ved 56 °C i 15 minutter ved 1100 o/min og deretter ved 80 °C i 15 minutter ved 1100 o/min.

Hvis det brukes kun én varmeblokk, la prøven stå i romtemperatur etter 56 °C-inkuberingen inntil varmeblokken har nådd 80 °C.

Merk: Fullstendig fordøyelse av vevet med proteinase K er ikke nødvendig for å oppnå maksimalt RNA-utbytte, men inkubasjonstrinnet ved 80 °C er avgjørende.

Viktig: Kontroller at varmeblokken har nådd 80 °C før du starter den 15 minutter lange inkuberingen. 15 minutters inkubering ved 80 °C er avgjørende for reversering av formaldehydverrbindinger og optimal RNA-ytelse i nedstrømsapplikasjoner som real-time RT-PCR.

10. Sentrifuger kort, og overfør ▲ 145 eller ● 230 µl av den nedre, ufargede fasen over i et nytt 1,5 ml mikrosentrifugerør.

11. Inkuber på is i 3 minutter. Sentrifuger deretter i 15 minutter ved 20 000 x g.

12. Overfør supernatanten til et nytt 2 ml mikrosentrifugerør, og sørg for at du ikke forstyrrer pelleten.

Pelleten inneholder uopløselige vevsrester, inkludert tvverbundet DNA.

13. Tilsett DNase Booster Buffer lik en tiendedel av det totale prøvevolumet (▲ 14,5 eller ● 23 µl) og 10 µl DNase I-arbeidsløsning. Bland ved å vende røret. Sentrifuger kort for å samle restvæske fra sidene av røret.

Merk: DNase I leveres i frysetørket form og skal rekonstitueres som beskrevet i «Klargjøring av DNase I-arbeidsløsning», side 16.

Merk: DNase I er spesielt følsomt for denaturering. Blanding skal kun utføres ved forsiktig invertering av røret. Ikke bruk vorteksblender.

14. Inkuber ved romtemperatur i 15 minutter.

15. Tilsett ▲ 320 eller ● 500 µl Buffer RBC for å justere bindingsbetingelsene, bland lysatet grundig i vorteksblender i 3 sekunder, og sentrifuger kort.

16. Tilsett ▲ 720 µl eller ■ 1200 µl etanol (96–100 %) i prøven. Skal ikke sentrifugeres. Gå umiddelbart videre til trinn 17.

Presipitater kan være synlige etter tilsetning av etanol. Dette påvirker ikke prosedyren.

17. Bland godt ved å pipettere 5 ganger opp og ned, og overfør 700 µl av prøven, inkludert eventuelt presipitat, til en RNeasy MinElute-spinnkolonnes plassert i et 2 ml prøvetakingsrør. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 15 sekunder ved $\geq 8000 \times g$. Kast prøvetakingsrøret med væsken*, og sett kolonnen i et nytt prøvetakingsrør (medfølger).

* Væsken inneholder Buffer RBC og er derfor ikke kompatibel med blekemiddel. Se side 8 for sikkerhetsinformasjon.

18. Gjenta trinn 17 (uten ytterligere blanding) til hele prøven har passert gjennom RNeasy MinElute-spinnkolonnen.
19. Tilsett 500 µl Buffer RPE i RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 15 sekunder ved $\geq 8000 \times g$. Kast prøvetakingsrøret med væsken*, og sett kolonnen i et nytt prøvetakingsrør (medfølger).

Merk: Buffer RPE leveres som et konsentrat. Sørg for at det tilsettes etanol før bruk som beskrevet i «Klargjøring av Buffer RPE».

20. Tilsett 500 µl Buffer RPE i RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 2 minutter ved $\geq 8000 \times g$ for å vaske spinnkolonnens membran. Kast prøvetakingsrøret med væsken†, og sett kolonnen i et nytt prøvetakingsrør (medfølger).
- Merk: Etter sentrifugering må RNeasy MinElute-spinnkolonnen fjernes forsiktig fra prøvetakingsrøret slik at kolonnen ikke kommer i kontakt med væsken. Ellers vil medrivning av etanol finne sted.
21. Åpne lokket til spinnkolonnen, og sentrifuger ved full hastighet i 5 minutter. Kast prøvetakingsrøret med væsken.

For å unngå skade på lokkene skal spinnkolonnene plasseres i sentrifugen med minst én tom posisjon mellom kolonnene. Vri lokkene slik at de peker i motsatt retning av rotorens rotasjonsretning (f.eks. hvis rotoren roterer med klokken, skal lokkene peke mot klokken).

Det er viktig å tørke spinnkolonnens membran, fordi etanolrester kan interferere med nedstrømsreaksjoner. Sentrifugering med åpne lokk sikrer at etanol ikke overføres under RNA-elusjon.

22. Plasser RNeasy MinElute-spinnkolonnen i et nytt 1,5 ml prøvetakingsrør (følger med). Tilsett 14–32 µl RNase-fritt vann direkte i midten av spinnkolonnens membran. Lukk lokket forsiktig, og sentrifuger i 1 minutt ved full hastighet for å eluere RNA-et.
- Elusjon med mindre volumer RNase-fritt vann fører til høyere totalt RNA-konsentrasjoner, men lavere RNA-utbytter.

† Væsken inneholder Buffer RBC og er derfor ikke kompatibel med blekemiddel. Se side 8 for sikkerhetsinformasjon.

Merk: For forventede lave RNA-utbytter anbefales bruk av et lavbindingsrør for elusjon (følger ikke med). Det gjennomsnittlige dødsvolumet til RNeasy MinElute-spinnkolonnen er 2 µl: elusjon med 14 µl RNase-fritt vann gir ca. 12 µl eluat.

23. Oppbevar RNA-eluatet ved -60 til -90 °C eller ved -15 til -30 °C i opptil 12 uker.

Merk: Eluatstabilitet vil avhenge av innholdet og typen isolert RNA, elusjonsvolum og oppbevaringsforhold. Vi anbefaler at brukerne etablerer eluatstabiliteten etter behov for de spesifikke kravene de har.

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem testes hvert parti med RNeasy DSP FFPE Kit mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Systemytelse har blitt fastslått i ytelseevalueringstudier som renser humant RNA fra formalinfikserte, parafininnstøpte prøver.

Det er brukerens ansvar å validere systemytelsen for alle prosedyrer anvendt i laboratoriet som ikke er dekt av QIAGENs ytelseevalueringstudier.

For å redusere risikoen for negativ innvirkning på de diagnostiske resultatene skal det brukes egnede kontroller for nedstrømsapplikasjoner.

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn.

Ytelseegenskaper

Aktuelle ytelseegenskaper ligger under fanen for ressurser på produktsiden til www.qiagen.com.

Avfallshåndtering

Avfallet inneholder prøver og reagenser. Dette avfallet kan inneholde giftig eller smittefarlig materiale og må kasseres på riktig måte. Se de lokale sikkerhetsforskriftene for riktige prosedyrer for kassering.

Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige på nett i PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatablader for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og/eller protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, besøk www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Tilstoppet RNeasy MinElute-spinnkolonne

- | | | |
|----|------------------------------------|---|
| a) | For mye startmateriale | Reduser mengden av startmateriale. Det er viktig å bruke riktig mengde utgangsmateriale (se side 15). |
| b) | Sentrifugeringsstemperatur for lav | Sentrifugeringsstemperaturen bør være 15–25 °C. Noen sentrifuger kan avkjøles til lavere enn 15 °C selv når de er satt til 20 °C. Dette kan forårsake dannelse av presipitat som kan tilstoppe RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Hvis dette skjer, setter du sentrifugeringsstemperaturen til 25 °C. |
-

Lavt RNA-utbytte

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Dårlig kvalitet på utgangsmaterialet | Prøver som har vært fiksert i mer enn 24 timer, eller som har vært oppbevart i svært lang tid, kan inneholde svært lite anvendelig RNA.
Snitt som har blitt montert på mikroskopobjektglass, kan gi svært lite anvendelig RNA på grunn av langvarig eksponering for luft. |
| b) | For mye startmateriale | Overbelastning av RNeasy MinElute-spinnkolonnen reduserer nukleinsyreutbyttet i vesentlig grad. Reduser mengden av startmateriale (se side 15). |
| c) | RNA fortsatt bundet til RNeasy MinElute spinnkolonnenmembran | Gjenta RNA-elusjon, men inkuber RNeasy MinElute-spinnkolonnen på bordflate i 10 minutter med RNFW før sentrifugering. |
| d) | Feil lagring av buffer/reagenser | RNeasy MinElute-spinnkolonner og DNase I må oppbevares ved 2–8 °C ved mottak av settet. Kontroller riktig lagringstemperatur da eksponering for høyere temperaturer over lengre perioder kan føre til tap av funksjonalitet. |
-

Kommentarer og forslag

Lav A_{260}/A_{280} -verdi

Vann brukt til å fortynne nukleinsyre for A_{260}/A_{280} -måling

Bruk 10 mM Tris Cl, pH 7,5, ikke vann, for å fortynne prøven før renheten måles.

DNA-kontaminering i nedstrømseksperimenter

- a) For mye startmateriale For noen vevstyper kan effektiviteten av DNA-fjerning reduseres ved behandling av svært store mengder. Hvis det eluerte RNA-et inneholder signifikant DNA-kontaminering, kan du prøve å behandle færre vevssnitt per preparat.
- b) Vevet har høyt DNA-innhold Ved behandling av svært store mengder vev som inneholder mye DNA (f.eks. thymus), kan det hende at DNA-et ikke blir fullstendig fordøyd. Gjenta rensingsprosedyren med færre vevssnitt.
- Kontroller at DNase I har blitt oppbevart korrekt som beskrevet i «Oppbevaring og håndtering av reagens» og «Klargjøring av DNase larbeidsløsning».
- c) Revers transkripsjon med utilstrekkelig mengde RNA De fleste reverse transkriptaser er beregnet for bruk med ca. 1 µg RNA. Hvis du utfører revers transkripsjon med svært små mengder RNA, anbefaler vi at du bruker en revers transkriptase som er spesielt utviklet for svært sensitiv revers transkripsjon.
-

RNA yter ikke bra i nedstrømsanalyser/applikasjoner

- a) RNA fragmentert eller blokkert på grunn av formaldehydmodifisering Inkuberingen ved 80 °C i RNeasy DSP FFPE-prosedyren er avgjørende for optimal RNA-ytelse ved revers transkripsjon og andre enzymatiske nedstrømsapplikasjoner. Sørg for at inkubasjonstemperaturen holdes på 80 °C gjennom hele inkubasjonstiden på 15 minutter.
- Selv om inkubering ved 80 °C fjerner noen av formaldehydmodifiseringene, er RNA renset fra FFPE-snitt ikke et optimalt templat for enzymatiske reaksjoner. Vi anbefaler at det kun brukes tilfeldige primere eller genspesifikke primere for cDNA-syntese. Vi anbefaler også å holde amplikonene så korte som mulig ved PCR (< 500 nukleotider).
- b) Etanolmedrivning Under den andre vasken med Buffer RPE må det sentrifugeres ved $\geq 8000 \times g$ i 2 minutter ved 15–25 °C for å tørke RNeasy MinElute-spinnkolonnens membran. Etter sentrifugering må kolonnen fjernes forsiktig fra prøvetakingsrøret slik at kolonnen ikke kommer i kontakt med væsken. Plasser deretter kolonnen i et nytt prøvetakingsrør, og sentrifuger ved full hastighet i 5 minutter.













Kommentarer og forslag








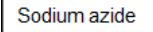

- c) Saltmedriving under RNA-elusjon Kontroller at Buffer RPE ble rekonstituert ved å tilsette riktig volum etanol og at bufferen har romtemperatur (15–25 °C).

- d) Revers transkripsjon med utilstrekkelig mengde RNA De fleste reverse transkriptaser er beregnet for bruk med ca. 1 µg RNA. Hvis du utfører revers transkripsjon med svært små mengder RNA, anbefaler vi at du bruker en revers transkriptase som er spesielt utviklet for svært sensitiv revers transkripsjon.

Symboler

Følgende symboler vises i bruksanvisningen eller på emballasjen og etiketter:

Symbol	Symbolforklaring
	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Siste forbruksdato
	Dette produktet oppfyller kravene i den europeiske bestemmelsen 2017/746 for in vitro-diagnostiske medisinske enheter.
	In vitro-diagnostisk medisinsk enhet
	Ved ankomst
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Katalognummer
	Partinummer
	Materialnummer (dvs. komponentmerking)
	Komponenter (dvs. en liste over hva som er inkludert)
	Inneholder (innhold)

Symbol	Symbolforklaring
	Antall (dvs. hetteglass, flasker)
	Globalt handelsvarenummer
Rn	R står for revisjon av bruksanvisningen (håndboken), og n er revisjonsnummeret
	Temperaturbegrensning
	Produsent
	Se bruksanvisningen
	Forsiktig
	Proteinase K
	Natriumazid
	Entydig utstyrsidentifikator

Kontaktinformasjon

Hvis du trenger teknisk hjelp eller mer informasjon, kan du gå til vårt tekniske supportcenter på www.qiagen.com/Support, ringe 00800-22-44-6000 eller kontakte en av QIAGENs tekniske serviceavdelinger eller lokale distributører (se bak på omslaget eller gå til www.qiagen.com).

Vedlegg: Generelle kommentarer om håndtering av RNA

Håndtere RNA

Ribonukleaser (RNaser) er svært stabile og aktive enzymer som vanligvis ikke trenger kofaktorer for å fungere. Siden RNaser er vanskelige å inaktivere og selv de minste mengdene er nok til å ødelegge RNA, skal det ikke brukes plast eller glass uten først å eliminere mulig RNase-kontaminasjon. Du bør være svært nøye med å unngå at RNaser utilsiktet introduseres i RNA-prøven under eller etter renseprosedyren. For å opprette og vedlikeholde et RNase-fritt miljø må du overholde visse forholdsregler under forhåndsbehandling og bruk av engangs- og ikke-engangskar og løsninger når du jobber med RNA.

Generell håndtering

Riktig mikrobiologisk, aseptisk teknikk skal alltid brukes ved arbeid med RNA. Det er bakterier på hender og støvpartikler, og disse er de vanligste kildene til RNase-kontaminering. Bruk alltid lateks- eller vinylhansker ved håndtering av reagenser og RNA-prøver for å forhindre RNase-kontaminering fra overflaten av huden eller fra støvete laboratorieutstyr. Bytt hansker ofte, og hold rørene lukket når det er mulig. Oppbevar rensed RNA på is når alikvoter pipetteres for nedstrømapplikasjoner.

For å fjerne RNase-kontaminering fra benkeoverflater, engangsplastartikler og laboratorieutstyr (f.eks. pipetter og elektroforesetanker) anbefales det å bruke RNaseZap® (kat.nr. AM9780) fra Ambion®. RNase-kontaminering kan eventuelt fjernes ved hjelp av vanlige laboratoriereagenser. For å dekontaminere plastartikler skyller du med 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA etterfulgt av RNase-fritt vann (se «Løsninger», side 32). Det er også mulig å skylle med kloroform hvis plastartikkelen er kloroformresistent. Elektroforesetanker dekontamineres ved å rengjøre med vaskemiddel (f.eks. 0,5 % SDS), skylle med RNase-fritt vann, skylle med etanol (hvis tankene tåler etanol) og la dem tørke.

Plastdeler til engangsbruk

Bruk av sterile polypropylenrør til engangsbruk anbefales gjennom hele prosedyren. Disse rørene er vanligvis RNase-frie og krever ingen forbehandling for å inaktivere RNaser.

Glassdeler

Glassdeler skal behandles før bruk for å sikre at de er RNase-fri. Glassartikler som brukes til RNA-arbeid, skal rengjøres med et vaskemiddel, skylles grundig og ovenstukes ved 240 °C i minst 4 timer (over natten, hvis det er mer praktisk) før bruk. Kun autoklaving vil ikke fullstendig inaktivere mange RNaser. Alternativt kan glassartikler behandles med DEPC (dietylpyrokarbonat), som beskrevet i «Løsninger» under.

Løsninger

Løsninger (vann og andre løsninger) skal behandles med 0,1 % DEPC. DEPC er en sterk, men ikke absolutt, inhibitor for RNaser. Det brukes vanligvis ved en konsentrasjon på 0,1 % for å inaktivere RNaser på glass- eller plastartikler eller for å opprette RNase-frie løsninger og RNase-fritt vann. DEPC inaktiverer RNaser ved kovalent modifisering. Tilsett 0,1 ml DEPC i 100 ml av løsningen som skal behandles, og rist kraftig for å løse opp DEPC. La løsningen inkubere i 12 timer ved 37 °C. Autoklaver i 15 minutter for å fjerne eventuelle spor av DEPC. DEPC vil reagere med primære aminer og kan ikke brukes direkte for å behandle Tris-bufre. DEPC er høyst ustabil i tilstedeværelsen av Tris-bufre og nedbrytes hurtig til etanol og CO₂. Ved klargjøring av Tris-bufre: Behandle først vann med DEPC, og oppløs deretter Tris for å lage passende buffer. Spormengder av DEPC vil modifisere purine rester i RNA gjennom karbetoksylering. Karbetoksyliert RNA overføres med svært lav effektivitet i cellefri systemer. Men dets evne til å danne DNA:RNA- eller RNA:RNA-hybrider er ikke betydelig påvirket med mindre en stor andel av purinrestene har blitt modifisert. Resterende DEPC må alltid elimineres fra løsninger eller kar gjennom autoklaving eller oppvarming til 100 °C i 15 minutter.

Merk: RNeasy-buffere er garantert RNase-frie uten DEPC-behandling og er derfor fri for DEPC-kontaminering.

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute-spinnkolonner, elusjonsrør, vaskerør, lyseringsrør, RNase-frie reagenser og buffere.	73604

Oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser finnes i håndboken eller brukerhåndboken for det aktuelle QIAGEN-settet. Håndbøker og brukerhåndbøker for QIAGEN-sett er tilgjengelige på www.qiagen.com eller kan fås på forespørsel fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller den lokale distributøren.

Revisjonshistorikk for dokument

Revisjon	Beskrivelse
R1, juni 2022	<p data-bbox="409 360 1005 451">Oppdatering til settversjon 2 for samsvar med IVDR. Ingen endring i protokoller eller ytelse sammenlignet med settversjon 1</p> <p data-bbox="409 480 1005 547">Oppdatert Advarsler og forsiktighetsregler (lagt til restrisiko, nødinformasjon)</p> <p data-bbox="409 568 689 593">Lagt til avsnitt for kassering</p>

Begrenset lisensavtale for RNeasy DSP FFPE Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet, og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i settet. QIAGEN gir ingen lisens når det gjelder noen av QIAGENS åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette settet sammen med andre komponenter som ikke er inkludert i dette settet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse ytterligere protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette settet og/eller bruk av det ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette settet og komponentene i det er lisensiert for engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller underforstått, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av settet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuell intellektuell eiendomsrett forbundet med settet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Varemerker: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific eller dets datterselskaper). Registrerte navn, varemerker, osv. som brukes i dette dokumentet, skal ikke anses som ubeskyttet ved lov, selv når de ikke er spesielt merket som sådan.
06/2022 HB-3027-001 1127532NO © 2022 QIAGEN. Med enerett.

