Únor 2023

Návod k použití soupravy QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit (příručka)

50

Verze 2

IVD

Pro diagnostické použití in vitro

Pro použití se soupravou QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

CE	Katalogové číslo
REF	60404
	QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, NĚMECKO
R2 MAT	1130780CS

Sample to Insight

Obsah

Účel použití 4
Určený uživatel 4
Popis a principy 5
Shrnutí a vysvětlení 5
Princip postupu 5
Dodávané materiály 7
Obsah soupravy 7
Součásti soupravy 8
Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky 9
Další reagencie 9
Spotřební materiály 9
Vybavení 9
Varování a bezpečnostní opatření 10
Informace o bezpečnosti 10
Informace pro případ nouze 11
Bezpečnostní opatření 11
Likvidace 12
Skladování reagencií a manipulace s nimi 13
Stabilita při používání 13
Uchovávání vzorku a manipulace s ním 14
Postup 15
Protokol: Izolace genomové DNA z tkáňových řezů FFPE 21

Kontrola kvality 25
Omezení 26
Charakteristika funkčních vlastností 27
Návod na řešení potíží 28
Symboly 29
Příloha: Manipulace 32
Informace pro objednání 33
Historie revizí dokumentu 34

Účel použití

Souprava QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit je systém, který využívá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp) k izolaci a purifikaci genomové DNA z biologických vzorků fixovaných formalinem, zalitých parafínem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Je určena pro účely ruční přípravy alikvotů a neposkytuje žádné kvalitativní ani kvantitativní výsledky testů.

Určený uživatel

Tento produkt je určen pro použití profesionálními uživateli, např. techniky a lékaři, vyškolenými v technikách molekulární biologie pro účely diagnostiky in vitro (In Vitro Diagnostic, IVD).

Popis a principy

Shrnutí a vysvětlení

Souprava QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit se používá k purifikaci DNA z tkáňových řezů FFPE. Využívá osvědčenou mikrotechnologii DNA QIAamp pro purifikaci genomové a mitochondriální DNA z malých objemů nebo velikostí alikvotů. Souprava kombinuje selektivní vazebné vlastnosti membrány založené na oxidu křemičitém s flexibilními elučními objemy.

Podmínky lýzy umožňují účinnou purifikaci genomové DNA z tkáňových řezů FFPE bez nutnosti inkubace přes noc. Inkubace při zvýšené teplotě po štěpení proteinázou K částečně odstraní zesíťování uvolněné DNA formalínem, což může zvýšit výtěžnost a zlepšit výkonnost DNA v následných analýzách. Vezměte prosím na vědomí, že DNA izolovaná z alikvotů FFPE má obvykle nižší molekulovou hmotnost než DNA z čerstvých nebo zmrazených alikvotů. Stupeň fragmentace závisí na typu a stáří alikvotu a na podmínkách použitých pro fixaci.

Po lýze alikvotu je jednoduchý postup pro soupravu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit vhodný pro současné zpracování více alikvotů.

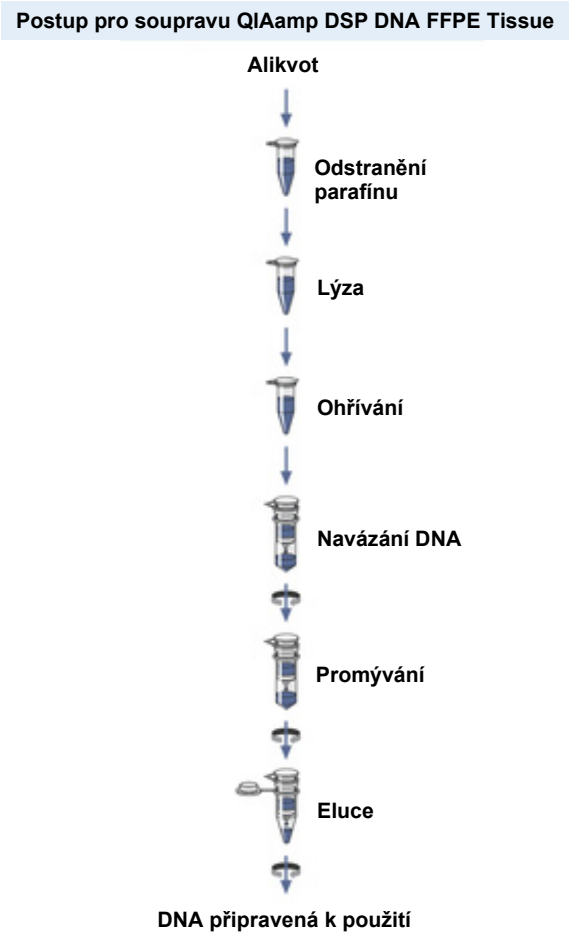
Každý uživatel je zodpovědný za validaci funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností výrobků QIAGEN®, které popisuje tato příručka.

Princip postupu

Postup pro soupravu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit sestává ze 6 kroků (obrázek 1):

- Odstranění parafínu: Parafín se rozpustí v xylenu a odstraní.

- Lýza: Alikvot se lyzuje při teplotě 56 °C za denaturačních podmínek pomocí proteinázy K.
- Ohřívání: Inkubace při teplotě 90 °C zvrátí zesíťování formalínem.
- Vázání: DNA se naváže na membránu a kontaminant projde skrz.
- Promývání: Zbytky kontaminantů se vymyjí.
- Eluce: Z membrány se eluuje čistá, koncentrovaná DNA.



Obrázek 1. Postup pro soupravu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Dodávané materiály

Obsah soupravy

Souprava QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	**(50)**
Katalogové č.	**60404**
Počet stanovení	**50**

	Označení	Symboly	Množství
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Kolonky QIAamp MinElute s promývacími zkumavkami)	COL	50
WT	Wash Tubes (Promývací zkumavky) (2 ml)	WASH TUBE	3 × 50
ET	Elution Tubes (Eluční zkumavky) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Lyzační zkumavky) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Pufr pro tkáňovou lýzu)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (Lyzační pufr)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Promývací pufr 1) (koncentrát)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Promývací pufr 1) (koncentrát)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer† (Eluční pufr)	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (Proteináza K)	PROTK	1,25 ml
–	Návod k použití (příručka)		1

* Obsahuje sůl guanidinu. Není kompatibilní s dezinfekčními přípravky obsahujícími bělící prostředky. Varování a bezpečnostní opatření jsou uvedeny na straně 10.

† Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

Součásti soupravy

Hlavní součásti soupravy jsou vysvětleny níže.

Tabulka 1. Účinné přísady v dodávaných reagenciích

Reagencie		Účinná přísada / Účinné přísady	Koncentrace (hm./hm.) [%]
Symbol	**Název**		
ATL	Buffer ATL	Dodecylsíran sodný	≥ 1 až < 10
AL	Buffer AL	Guanidinhydrochlorid Kyselina maleinová	> 30 až < 50 ≥ 0,1 až < 1
AW1	Buffer AW1	Guanidinhydrochlorid Etanol	≥ 50 až < 70 ≥ 10 až < 90
AW2	Buffer AW2	Etanol	≥ 10 až < 90
ATE	Buffer ATE	Žádná	–
PK	Proteinase K (Proteináza K)	Proteináza K	≥ 1 až < 10

Pro minimalizaci rizika negativního dopadu na diagnostické výsledky získané po izolaci DNA je zapotřebí používat pro následné aplikace odpovídající kontroly.

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL) které obdržíte od dodavatele výrobku.

Další reagencie

- Xylen
- Etanol (96–100%)*

Spotřební materiály

- Pokud se rozhodnete nepoužít zkumavky dodané v soupravě, doporučujeme 1,5ml nebo 2ml mikrocentrifugační zkumavky (pro kroky lýzy) a 1,5ml mikrocentrifugační zkumavky (pro eluční kroky) (např. dostupné od společnosti Sarstedt®, kat. č. 72.690). Doporučujeme zkumavky kónického tvaru bez DNázy/RNázy s bezpečnostním víčkem. Každý uživatel je zodpovědný za validaci funkčnosti systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčnosti výrobků QIAGEN.
- Pipety a pipetovací špičky (pro zamezení křížové kontaminace důrazně doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovými bariérami)

Vybavení†

- Termomixer‡, vyhřívaný orbitální inkubátor, topný blok nebo vodní lázeň s možností inkubace při teplotě 56 °C, 70 °C a 90 °C
- Mikrocentrifuga† (s rotorem pro 2ml zkumavky)
- Třepačka vortex

* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.
† Před použitím zajistěte, aby byly přístroje zkontrolovány a nakalibrovány podle doporučení výrobce.
‡ Pro zajištění správného zpracování alikvotů při postupech QIAamp DSP DNA FFPE důrazně doporučujeme použití přístrojů kalibrovaných podle doporučení výrobce.

Varování a bezpečnostní opatření

Na základě řízení rizik ve společnosti QIAGEN byla do návrhu výrobku implementována všechna zamýšlená opatření pro kontrolu rizik. Celkové zbytkové riziko je hodnoceno jako přijatelné a používání prostředku je považováno za bezpečné. Tato příručka obsahuje pokyny, varování a bezpečnostní opatření k zajištění bezpečnosti a funkčnosti prostředku. Je třeba je striktně dodržovat.

Vezměte prosím na vědomí, že podle místních předpisů od vás může být vyžadováno nahlášení závažných událostí, ke kterým došlo v souvislosti s prostředkem, a to výrobci a/nebo jeho autorizovanému zástupci a regulačnímu orgánu, pod nějž uživatel a/nebo pacient spadá.

Informace o bezpečnosti

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online v praktickém a kompaktním formátu PDF na stránkách **www.qiagen.com/safety**, kde můžete nalézt, zobrazit a vytisknout BL pro každou soupravu QIAGEN i pro každou součást těchto souprav.

UPOZORNĚNÍ NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělicích prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy alikvotů.

- Pufry Buffer AL a Buffer AW1 obsahují guanidinhydrochlorid, který může při smíšení s bělicím prostředkem vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny.
- Pokud dojde k rozlití kapalin obsahujících tyto pufry, vyčistěte místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Pokud rozlitá kapalina obsahuje případná infekční agens, vyčistěte zasažené místo nejdříve laboratorním detergentem a vodou, a potom 1% (v/v) roztokem chlornanu sodného.
- Vzorky a alikvoty jsou potenciálně infekční. Vzorky a odpad z analýzy zlikvidujte v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Informace pro případ nouze

CHEMTREC

USA a Kanada 1-800-424-9300

Mimo USA a Kanadu +1 703-527-3887

Bezpečnostní opatření

Buffer AL

Obsahuje: guanidinhydrochlorid a kyselinu maleinovou. Varování! Může být škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Pokud podráždění očí přetrvává: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Opatrně oplachujte vodou po dobu několika minut. Pokud zasažená osoba používá kontaktní čočky, vyjměte je (pokud je to možné). Pokračujte v oplachování. Sundejte kontaminovaný oděv a před opětovným použitím jej vyperte. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Omyjte velkým množstvím mýdla a vody. V případě, že dojde k podráždění pokožky: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

Buffer ATL

Varování! Způsobuje mírné podráždění kůže. V případě, že dojde k podráždění pokožky: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Buffer AW1

Obsahuje: guanidinhydrochlorid. Varování! Škodlivý při požití nebo při vdechnutí. Způsobuje podráždění kůže. Způsobuje vážné podráždění očí. Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře, pokud se necítíte dobře. Obsah/nádobu likvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu. Sundejte kontaminovaný oděv a před opětovným použitím jej vyperte. Používejte ochranné rukavice / ochranný oděv / ochranné brýle / obličejový štít.

Proteinase K

Obsahuje: proteinázu Proteinase K. Nebezpečí! Způsobuje mírné podráždění kůže. Při vdechnutí může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu, případně dechové obtíže. Vyvarujte se vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/výparů/aerosolů. Obsah/nádobu likvidujte ve schváleném zařízení na likvidaci odpadu. Při dýchacích potížích: Kontaktujte TOXIKOLOGICKÉ CENTRUM nebo lékaře. PŘI VDECHNUTÍ: Při obtížném dýchání přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte ho v klidu v poloze usnadňující dýchání. Používejte ochranný respirátor.

Likvidace

Odpad obsahuje alikvoty a reagencie. Tento odpad může obsahovat toxické nebo infekční materiály a musí být řádně zlikvidován. Postupujte při likvidačních procedurách v souladu s místními bezpečnostními předpisy.

Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL). Bezpečnostní listy jsou k dispozici online ve formátu PDF na stránkách **www.qiagen.com/safety**, kde si uživatelé mohou vyhledat, zobrazit a vytisknout bezpečnostní listy pro každou soupravu QIAGEN a pro součásti příslušné soupravy.

Skladování reagencií a manipulace s nimi

Kolonky QIAamp MinElute by se měly po doručení uchovávat při teplotě 2–8 °C a lze je používat až do doby exspirace uvedené na krabici soupravy.

Všechny pufry mohou být uchovávány při teplotě místnosti (15–25 °C) a jsou stabilní až do data exspirace soupravy, nejsou-li otevřené.

Stabilita při používání

Rekonstituované pufry Buffer AW1 a Buffer AW2 lze skladovat při teplotě místnosti (15–25 °C) po dobu až 1 roku nebo do data exspirace soupravy podle toho, které období je kratší.

Uchovávání vzorku a manipulace s ním

Souprava QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit byla vyvinuta pro použití se vzorky FFPE.

Stabilita DNA závisí na různých faktorech, jako je odběr vzorků, manipulace s nimi, jejich příprava a podmínky skladování, které mohou ovlivnit její použití v následné aplikaci. Je důležité si prostudovat návod k použití konkrétní následné aplikace a/nebo ověřit a validovat celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek.

Obecné informace o laboratorních postupech pro odběr, manipulaci, přípravu a podmínky skladování vzorků FFPE jsou uvedeny v normě ISO 20166-3:2018 „Molekulární diagnostická vyšetření in vitro – Specifikace předvyšetřovacích postupů pro formalinem fixovanou a parafínem archivovanou (FFPE) tkáň – Část 3: Izolovaná DNA“ a v dokumentu institutu CLSI MM13-A „Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline“ (Odběr, přeprava, příprava a skladování vzorků pro molekulární metody; schválený pokyn).

DNA se eluuje v pufru Buffer ATE a je okamžitě připravena k použití v amplifikačních reakcích nebo ke skladování (podmínky závisejí na požadavcích uživatele). Doporučené podmínky skladování pro konkrétní následné aplikace QIAGEN naleznete v příručkách k příslušným soupravám.

Postup

Důležité body před zahájením používání

- Všechny reagencie dodávané v soupravě QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit jsou určeny k použití výhradně s ostatními reagenciemi ve stejné soupravě QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Má-li být zachována optimální funkčnost, nelze se soupravou používat žádné náhradní reagencie.
- Po obdržení soupravy zkontrolujte, zda nejsou její součásti poškozené. V případě poškození obalů nebo láhví s pufrem kontaktujte oddělení technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora. V případě rozlití kapaliny postupujte podle pokynů uvedených v části „Varování a bezpečnostní opatření“ (str. 10). Nepoužívejte poškozené součásti soupravy, protože použití takových součástí by mohlo negativně ovlivnit funkčnost soupravy.
- Při práci se soupravou nepoužívejte součásti jiných souprav, pokud nemají stejné číslo šarže.
- Zamezte mikrobiální kontaminaci reagencií soupravy.
- Tuto soupravu smí používat pouze personál školený v laboratorních metodách diagnostiky in vitro.
- Při manipulaci s reagenciemi a alikvoty vždy noste latexové nebo vinylové rukavice, abyste zabránili kontaminaci z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Ruce a prachové částice mohou přenášet bakterie a plísně a jsou to časté zdroje kontaminace. Rukavice často vyměňujte a zkumavky uchovávejte zavřené.
- Nepoužité pufry, průtočné roztoky a zbytky alikvotů by měly být zlikvidovány podle místních postupů.
- Pokud používáte vlastní plastové vybavení, doporučuje se během celého postupu purifikace používat jednorázové polypropylenové 1,5- až 2ml kónické zkumavky bez DNázy/RNázy s nízkou vazností a s bezpečnostními víčky.
- Všechny kroky centrifugace provádějte při teplotě místnosti (15–25 ºC).

- Všechny pufry by se měly skladovat při teplotě místnosti (15–25 °C) a před použitím by se měly dobře promíchat.
- Nastavte termomixér nebo vyhřívaný orbitální inkubátor na teplotu 56 °C pro použití v 9. kroku. Pokud není termomixér nebo vyhřívaný orbitální inkubátor k dispozici, lze místo něj použít topný blok nebo vodní lázeň.
- Pokud pufr Buffer AL nebo Buffer ATL obsahuje precipitáty, rozpustí se zahřátím na teplotu 70 °C za mírného míchání.
- Zajistěte, aby byly připraveny pufry Buffer AW1 a Buffer AW2 podle pokynů uvedených níže.
- Postupy kontroly kvality ve společnosti QIAGEN používají funkční testování soupravy před vydáním pro každou jednotlivou šarži soupravy. Nemíchejte proto reagencie z různých šarží souprav ani nekombinujte jednotlivé reagencie z různých šarží reagencií.

Příprava pufrů

Příprava pufru Buffer ATL

- Před zahájením postupu, zkontrolujte, zda se v pufru Buffer ATL nevytvořil precipitát. V případě potřeby jej rozpusťte zahřátím na teplotu 70 °C s jemným mícháním.

Příprava pufru Buffer AL

- Před zahájením postupu, zkontrolujte, zda se v pufru Buffer AL nevytvořil precipitát. V případě potřeby jej rozpusťte zahřátím na teplotu 70 °C s jemným mícháním.

Příprava pufru Buffer AW1

- Do láhve obsahující 19 ml koncentrovaného pufru Buffer AW1 přidejte 25 ml etanolu (96–100 %)*. Zaškrtněte zaškrtávací políčko na štítku láhve jako označení, že byl přidán etanol. Rekonstituovaný pufr Buffer AW1 lze skladovat při teplotě místnosti (15–25 °C) po dobu až 1 roku nebo do data exspirace soupravy podle toho, které období je kratší. Doporučujeme napsat datum rekonstituce na štítek pufru.

  Poznámka: Před zahájením postupu promíchejte rekonstituovaný pufr Buffer AW1 protřepáním.

Příprava pufru Buffer AW2

- Do láhve obsahující 13 ml koncentrovaného pufru Buffer AW2 přidejte 30 ml etanolu (96–100 %)*. Zaškrtněte zaškrtávací políčko na štítku láhve jako označení, že byl přidán etanol. Rekonstituovaný pufr Buffer AW2 lze skladovat při teplotě místnosti (15–25 °C) po dobu až 1 roku nebo do data exspirace uvedeného na soupravě podle toho, které období je kratší. Doporučujeme napsat datum rekonstituce na štítek pufru.

  Poznámka: Před zahájením postupu promíchejte rekonstituovaný pufr Buffer AW2 protřepáním.

Výchozí materiál

Výchozím materiálem pro purifikaci DNA jsou připravené řezy tkáně FFPE (ideálně čerstvě nařezané). V 1 preparátu lze kombinovat více řezů. Pokud nebudete mít žádné informace o povaze svého výchozího materiálu, doporučuje začít s nejvýše 3 řezy v jediném preparátu.

* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako například metanol nebo metyletylketon.

Uživatel by měl počet řezů, tloušťku řezů a plochu řezů optimalizovat pro všechny postupy používané v laboratoři. Pokud se tato souprava používá spolu s následnou aplikací QIAGEN, pokyny najdete v příslušné příručce.

Postup manipulace pro zamezení křížové kontaminace

Vzhledem k senzitivitě technik amplifikace nukleových kyselin je třeba při manipulaci s kolonkami QIAamp MinElute dodržovat následující preventivní opatření, aby nedošlo ke křížové kontaminaci mezi alikvoty:

- Nepřeplňujte zkumavky tkáněmi.
- Při seškrabávání tkáně mezi jednotlivými alikvoty vyměňujte skalpely.
- Alikvot nebo roztok vkládejte do kolonky QIAamp MinElute opatrně. Napipetujte alikvot do kolonky QIAamp MinElute, aniž byste navlhčili okraj kolonky.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.
- Při promývání alikvotů vždy používejte nové promývací zkumavky.
- Před mícháním na vortexu a centrifugací se ujistěte, že jsou víčka zkumavek zcela uzavřena.
- Před centrifugací se ujistěte, že je kolonka QIAamp MinElute zcela uzavřena.
- Po všech krocích protřepávání na pulzní třepačce a krocích inkubace při teplotě 90 °C mikrocentrifugační zkumavky krátce centrifugujte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víček.
- Kolonky QIAamp MinElute otevírejte postupně po jedné a dbejte na to, aby nevznikaly aerosoly.
- Mezi jednotlivými alikvoty vždy vyměňte skalpely.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Pro minimalizaci křížové kontaminace doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovou bariérou a nepoužívat vícekrokové pipety.
- Používejte vždy rukavice na jedno použití a pravidelně kontrolujte, zda nejsou kontaminované materiálem alikvotu. Pokud máte podezření, že jsou rukavice kontaminované, zlikvidujte je.
- Zkumavky otevírejte postupně po jedné.

Centrifugace

Kolonky QIAamp MinElute se vejdou do většiny standardních mikrocentrifugačních zkumavek o objemu 1,5–2 ml. Centrifugace kolonek QIAamp MinElute se provádí přibližně při 6 000 x *g*, aby se snížil hluk centrifugy. Centrifugace při plných otáčkách výtěžnost DNA nezvýší. Kolony QIAamp MinElute je však nutné centrifugovat při plných otáčkách ve 2 krocích postupu: v kroku centrifugace, při níž dochází k vysušení po promytí membrán, a v kroku eluce. Centrifugace při plných otáčkách je nutná také k tomu, aby se alikvot po ošetření xylenem a promytí etanolem dostal do spodní části.

Veškeré centrifugační kroky je nutno provádět při teplotě místnosti (15–25 °C). Nízká teplota centrifugace může vést k neoptimální extrakci.

Zpracování kolonek QIAamp MinElute v mikrocentrifuze

- Kolonky QIAamp MinElute před jejím vložením do mikrocentrifugy uzavřete.
- Nedotýkejte se membrány kolonky QIAamp MinElute pipetovací špičkou.
- Frakce průtoku mohou obsahovat nebezpečný odpad a je třeba je odpovídajícím způsobem zlikvidovat.
- Pro efektivní paralelní zpracování více alikvotů doporučujeme naplnit stojánek na zkumavky promývacími zkumavkami, do nichž bude možné kolonky QIAamp MinElute po centrifugaci přenést. Použité promývací zkumavky obsahující průtočný roztok lze zlikvidovat a nové promývací zkumavky obsahující kolonky QIAamp MinElute lze umístit přímo do mikrocentrifugy.
- Zajistěte úplnou sledovatelnost alikvotů během celého zpracování.

Eluce purifikované DNA

U navazujících aplikací, které vyžadují malé počáteční objemy (např. některé PCR analýzy), může koncentrovanější eluát zvýšit citlivost analýzy, ale může také vést ke zvýšení koncentrace potenciálních inhibitorů.

Zvýšení elučního objemu sníží koncentraci DNA v eluátu.

Objem získaného eluátu může být přibližně o 5 µl menší než objem pufru Buffer ATE naneseného na kolonku QIAamp MinElute. Například při elučním objemu 20 µl vznikne ≥ 15 µl eluátu. Objem získaného eluátu závisí na povaze alikvotu.

Za optimalizaci elučního objemu pro všechny postupy používané v dané laboratoři zodpovídá uživatel. Doporučené eluční objemy potřebné pro konkrétní následné aplikace QIAGEN naleznete v příručkách k soupravám.

Výtěžnost se může zvýšit, pokud se kolonka před centrifugací inkubuje s pufrem Buffer ATE při pokojové teplotě například 5 minut. Eluovaná DNA se shromažďuje v 1,5ml elučních zkumavkách (součást soupravy). Podmínky skladování eluované DNA závisejí na požadavcích definovaných uživatelem. Doporučené podmínky skladování pro konkrétní následné aplikace QIAGEN naleznete v příručkách k soupravám.

Protokol: Izolace genomové DNA z tkáňových řezů FFPE

Postup

1. Skalpelem odřízněte přebytečný parafín z bloku alikvotu.
2. Řezy připravujte podle standardních laboratorních postupů (viz část „Výchozí materiál“, strana 17). Uživatel by měl počet řezů, tloušťku řezů a plochu řezů optimalizovat pro všechny postupy používané v laboratoři. Zajistěte, aby byla během celého postupu zachována sledovatelnost alikvotů.
3. Tkáň z řezů ihned seškrábněte sterilním skalpelem do lyzační zkumavky (součást soupravy). Ujistěte se, že je do zkumavky vložena veškerá dostupná tkáň. K alikvotu přidejte 1 ml xylenu, zavřete víčko a prudce promíchejte na vortexu, dokud se parafín nerozpustí (např. 10 sekund). Ujistěte se, že je zkumavka zcela uzavřena, aby se zabránilo rozlití xylenu, křížové kontaminaci mezi alikvoty a možnému kontaktu s xylenem.

   Poznámka: Xylen používejte v digestořích nebo jiných vhodných ochranných zařízeních.
4. Tkáňovou peletku centrifugujte při plných otáčkách po dobu přibližně 2 minut při teplotě místnosti. Pokud se žádná tkáňová peletka nevytvořila, tento krok opakujte.

   Poznámka: Nízká teplota centrifugace může vést k neoptimální extrakci.
5. Supernatant odstraňte pipetováním a poté zlikvidujte. Peletky si ponechte.

   Supernatant obsahuje xylen, který je nebezpečným odpadem a měl by být řádně zlikvidován podle místních předpisů.
6. Ke tkáňové peletce přidejte 1 ml etanolu (96–100 %) a důkladně promíchejte ve vortexu.

   Etanol extrahuje z alikvotu zbytkový xylen a měl by být vhodným způsobem zlikvidován.

7. Centrifugujte plnou rychlostí přibližně 2 minuty při teplotě místnosti.

   Supernatant opatrně odstraňte pipetováním. Neodebírejte žádnou peletku.

   Pomocí jemné pipetovací špičky opatrně odeberte veškerý zbytkový etanol. Otevřete zkumavku a inkubujte při teplotě 15–40 °C, dokud se veškerý zbytkový etanol neodpaří. Aby extrakce byla úspěšná, je odstranění zbytkového etanolu rozhodující.

   Poznámka: Nižší inkubační teplota zpomaluje dobu odpařování, zatímco vyšší teplota může peletky vysušit příliš a ztížit jejich suspendování.

8. Peletku znovu suspendujte ve 180 µl pufru Buffer ATL. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte na vortexu.

   Poznámka: Peletky musejí být v pufru Buffer ATL dobře resuspendovány, aby se zajistila maximální výtěžnost.

9. Inkubujte přibližně 1 hodinu při teplotě 56 °C (nebo dokud nedojde k úplné lýze alikvotu).

10. Inkubujte při teplotě 90 °C po dobu 1 hodiny.

    Inkubace při teplotě 90 °C v pufru Buffer ATL částečně zvrátí formaldehydovou modifikaci nukleových kyselin. Kratší doba inkubace nebo nižší inkubační teploty mohou mít dopad na kvalitu a množství DNA. Pokud použijete pouze 1 topný blok, nechte alikvot po 56°C inkubaci při teplotě místnosti, dokud topný blok nedosáhne teploty 90 °C.

11. Zkumavku krátce centrifugujte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víčka.

12. K alikvotu přidejte 200 µl pufru Buffer AL a důkladně promíchejte na vortexu. Poté přidejte 200 µl etanolu (96–100%) a znovu důkladně promíchejte na vortexu.

    Je důležité, aby se alikvot, pufr Buffer AL a etanol okamžitě a důkladně promíchaly na vortexu nebo pipetováním, aby vznikl homogenní roztok. Pufr Buffer AL a etanol lze předem smíchat a přidat společně v 1 kroku, aby se při zpracování více alikvotů ušetřil čas. Po přidání pufru Buffer AL a etanolu se může vytvořit bílý precipitát. Tento precipitát s postupem QIAamp neinterferuje. Vždy používejte čerstvou směs a po použití ji ihned zlikvidujte.

13. Zkumavku krátce centrifugujte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany víčka.
14. Opatrně přeneste celý lyzát do kolonky QIAamp MinElute (ve 2ml promývací zkumavce), aniž byste navlhčili okraj, zavřete víčko a centrifugujte při otáčkách 6 000 x *g* po dobu ≥ 1 minuty. Umístěte kolonku QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky (součást soupravy) a promývací zkumavku obsahující průtočný roztok zlikvidujte.

    Pokud lyzát po centrifugaci membránou zcela neprošel, centrifugujte znovu při vyšších otáčkách, dokud se kolonka QIAamp MinElute nevyprázdní.
15. Opatrně otevřete kolonku QIAamp MinElute a přidejte 500 µl rekonstituovaného pufru Buffer AW1, aniž by došlo k navlhčení okraje. Uzavřete víčko a centrifugujte při otáčkách 6 000 x *g* po dobu ≥ 1 minuty. Umístěte kolonu QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky a promývací zkumavku obsahující průtočný roztok zlikvidujte.
16. Opatrně otevřete kolonku QIAamp MinElute a přidejte 500 µl rekonstituovaného pufru Buffer AW2, aniž by došlo k navlhčení okraje. Uzavřete víčko a centrifugujte při otáčkách 6 000 x *g* po dobu ≥ 1 min. Umístěte kolonu QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky a promývací zkumavku obsahující průtočný roztok zlikvidujte.

    Je třeba zabránit kontaktu mezi kolonkou QIAamp MinElute a průtočným roztokem. Ujistěte se, že je rotor centrifugy vyvážen. Rotory některých centrifug mohou při zpomalení vibrovat, což má za následek průtočný roztok s obsahem etanolu, který přijde do styku s kolonkou QIAamp MinElute. Při vyjímání kolonky QIAamp MinElute a promývací zkumavky z rotoru dbejte na to, aby se průtočný roztok nedostal do kontaktu s kolonkou QIAamp MinElute.
17. Centrifugujte při plných otáčkách (přibližně 20 000 x *g*) po dobu přibližně 3 minut, aby se membrána vysušila.

    Přenos etanolu do eluátu může způsobovat problémy v některých následných aplikacích.

18. Vložte kolonku QIAamp MinElute do čisté 1,5ml eluční zkumavky (součást soupravy) a promývací zkumavku obsahující průtočný roztok zlikvidujte. Opatrně otevřete víčko kolonky QIAamp MinElute a přidejte 20–200 µl pufru Buffer ATE do středu membrány.

    Důležité: Pokud používáte malé eluční objemy (< 50 µl), dávkujte pufr Buffer ATE na střed membrány, abyste zajistili úplnou eluci navázané DNA. Kolonky QIAamp MinElute poskytují flexibilitu při výběru elučního objemu. Vyberte objem podle požadavků následné aplikace. Objem eluátu může být přibližně o 5 µl menší než objem pufru elučního roztoku naneseného na kolonku.

19. Uzavřete víčko a inkubujte při teplotě místnosti (15–25 °C) po dobu nejméně 1 minuty. Centrifugujte při plných otáčkách (přibližně 20 000 x *g*) po dobu ≥ 1 minuta.

    Inkubace kolonky QIAamp MinElute naplněné pufrem Buffer ATE po dobu přibližně 5 minut při teplotě místnosti před centrifugací může zvýšit výtěžek DNA.

Kontrola kvality

V souladu se systémem řízení kvality společnosti QIAGEN, certifikovaným podle norem ISO, je každá šarže souprav QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit podrobena testům předem definovaných parametrů, které zajišťují odpovídající kvalitu výrobků.

Omezení

Funkčnost soustavy byla stanovena použitím tkání FFPE pro izolaci genomové DNA.

Nedostatečná nebo nadměrná fixace může ovlivnit kvalitu DNA, což má za následek špatné výsledky v následných analýzách.

Zbytkový formalín může inhibovat krok štěpení proteinázou K; před zalitím alikvoty důkladně zbavte vody.

Za validaci funkčních vlastností systémů u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností výrobků QIAGEN, zodpovídá uživatel.

Pro minimalizaci rizika negativního dopadu na diagnostické výsledky je zapotřebí používat pro následné aplikace odpovídající kontroly. Pro další validaci se doporučují pokyny Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků (ICH) uvedené v dokumentu ICH Q2(R1) Validace analytických postupů: Text a metodologie.

Jakékoliv získané diagnostické výsledky se musí interpretovat v kontextu ostatních klinických nebo laboratorních nálezů.

Při použití soupravy QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit lze RNA kopurifikovat s DNA, pokud je v alikvotu přítomna.

Charakteristika funkčních vlastností

Platné charakteristiky funkčních vlastností jsou k dispozici pod kartou zdrojů na produktové stránce na webových stránkách **www.qiagen.com**.

Návod na řešení potíží

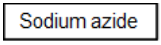
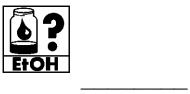
Uvedené návody mohou pomoci při řešení potíží, které mohou nastat při práci se systémem. Další informace můžete najít také mezi častými dotazy (Frequently Asked Questions, FAQ) na stránkách našeho centra technické podpory: **www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx**. Vědci z technické podpory společnosti QIAGEN vždy rádi zodpoví vaše otázky ohledně údajů a/nebo protokolů v této příručce i obecně k technologiím pro přípravu alikvotů a jejich analýz (kontaktní údaje naleznete na webových stránkách **www.qiagen.com**).

		Komentáře a návrhy
Zanesené kolonky QIAamp MinElute		
a)	Příliš mnoho výchozího materiálu	Snižte množství výchozího materiálu. Je nezbytné použít správné množství výchozího materiálu (viz strana 17).
b)	Příliš nízká teplota při centrifugaci	Teplota při centrifugaci by měla být 15–25 °C. Některé centrifugy se mohou ochladit na teplotu nižší než 15 °C, i když jsou nastaveny na 20 °C. To může způsobit tvorbu precipitátů, které mohou ucpat kolonky QIAamp MinElute. Pokud k tomu dojde, nastavte teplotu centrifugace na 15–25 °C.
Nízký výtěžek DNA		
a)	Příliš mnoho výchozího materiálu	Přetížení kolonky QIAamp MinElute Spin Column výrazně snižuje výtěžky nukleových kyselin. Snižte množství výchozího materiálu (viz strana 17).
b)	DNA stále navázaná na membránu kolonky MinElute Spin Column RNeasy	Zopakujte eluci DNA, ale před centrifugací inkubujte kolonku QIAamp MinElute Spin Column na pracovním stole po dobu 10 minut s pufrem Buffer ATE (elační pufr).
c)	Nesprávné skladování pufrů/reagencií	Kolonky QIAamp MinElute Spin Columns je třeba po dodání soupravy skladovat při teplotě 2–8 °C. Zkontrolujte správnou teplotu skladování, protože vystavení vyšším teplotám po delší dobu může vést ke ztrátě funkčních vlastností.
Nízká hodnota A_{260}/A_{280}		
Při měření A_{260}/A_{280} byla nukleová kyselina naředěna vodou		K ředění alikvotu před měřením čistoty použijte 10mM Tris Cl, pH 7,5, nikoli vodu.
DNA nemá dobré funkční vlastnosti v následných analýzách/aplikacích		
Přenos etanolu		Ve 2 krocích postupu je nutná centrifugace kolonek QIAamp MinElute při plných otáčkách: Během druhého promývání pufrem Buffer AW2 nezapomeňte centrifugovat při otáčkách ≥ 8 000 x *g* po dobu 2 minut při teplotě 15–25 °C, aby se membrána kolonky QIAamp MinElute Spin Column vysušila. Po centrifugaci kolonku ze sběrné zkumavky opatrně vyjměte tak, aby se kolonka nedotkla průtočného roztoku. Poté vložte kolonku do nové odběrové zkumavky a centrifugujte při plných otáčkách po dobu 5 minut. Centrifugace při plných otáčkách je nutná také pro přesun alikvotu do spodní části po ošetření xylenem a promytí etanolem.

Symboly

V návodu k použití anebo na obalu a značení se objevují následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
<N>	Obsahuje dostatek reagencií pro <N> reakcí
	Použijte do
	Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 pro diagnostické zdravotnické prostředky in vitro.
	Zdravotnický prostředek pro diagnostiku in vitro
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu (tj. označení dílu)
	Komponenty
	Obsahuje
	Číslo
	Globální číslo obchodní položky

Symbol	Definice symbolu
Rn	R označuje revizi návodu k použití a n je číslo revize
	Teplotní rozmezí
	Výrobce
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem
	Varování/upozornění
	Proteináza K
	Azid sodný
	Při dodání
	Zapište aktuální datum přidání etanolu do láhve
	Etanol

Symbol	Definice symbolu
	Přidání
	Guanidinhydrochlorid
	Kyselina maleinová
	Jedinečný identifikátor prostředku

Příloha: Manipulace

Obecné pokyny k manipulaci

Při manipulaci s reagenciemi a alikvoty vždy noste latexové nebo vinylové rukavice, abyste zabránili kontaminaci z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Ruce a prachové částice mohou přenášet bakterie a plísně a jsou to časté zdroje kontaminace. Rukavice často vyměňujte a zkumavky uchovávejte zavřené. Zamezte mikrobiální kontaminaci reagencií soupravy.

Jednorázové plastové vybavení

Během tohoto postupu se doporučuje používat jednorázové sterilní polypropylenové zkumavky.

Informace pro objednání

Výrobek	Obsah	Kat. č.
Souprava QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – pro purifikaci genomové DNA z tkání zalitých v parafínu		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Pro přípravu 50 alikvotů DNA: 50 kolonek QIAamp MinElute, proteináza K, pufry, promývací zkumavky (2 ml), eluční zkumavky (1,5 ml), lyzační zkumavky (2 ml)	60404

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifické pro výrobek jsou uvedeny v návodu k použití příslušné soupravy QIAGEN. Návody k použití souprav QIAGEN jsou k dispozici na webových stránkách **www.qiagen.com** nebo si je lze vyžádat od oddělení technických služeb společnosti QIAGEN či místního distributora.

Historie revizí dokumentu

Revize	Popis
R1, červen 2022	● Aktualizace soupravy na verzi 2 kvůli souladu s nařízením IVDR ● Aktualizace části Popis a principy ● Aktualizace části Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky ● Aktualizace části Varování a bezpečnostní opatření ● Aktualizace části Skladování reagencií a manipulace s nimi ● Aktualizace části Návod na řešení potíží ● Aktualizace přílohy Příloha
R2, únor 2023	● Aktualizace oddílu Skladování vzorků a manipulace s nimi

Omezené licenční ujednání pro soupravu QIAamp DSP DNA Kit

Používáním tohoto výrobku vyjadřuje každý kupující nebo uživatel výrobku svůj souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento výrobek se může používat výhradně v souladu s protokoly poskytnutými s tímto výrobkem a touto příručkou a pro použití pouze s komponenty dodanými v panelu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v tomto panelu, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v tomto panelu obsaženy, s výjimkou případů popsaných v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách **www.qiagen.com**. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků společnosti QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN důkladně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou jinou záruku než výslovně stanovené licence v tom smyslu, že tento panel a/nebo jeho použití nenarušuje práva třetích stran.
3. Tento panel a jeho komponenty jsou licencovány k jednorázovému použití a nesmí se používat opakovaně, přepracovávat ani opakovaně prodávat.
4. Společnost QIAGEN specificky odmítá jakékoliv další výslovné nebo nepřímé licence s výjimkou těch, které jsou uvedeny výslovně.
5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že nepodnikne ani nikomu jinému neumožní podniknout žádné kroky, které by mohly vést k jakékoliv shora zakázané činnosti nebo ji usnadnily. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem a/nebo jeho součástmi.

Aktualizované licenční podmínky jsou uvedeny na webových stránkách **www.qiagen.com**.

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

Únor 2023 HB-3033-002 1130780CS © 2023 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.