

decembrie 2017

Fișă de protocol QIAsymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP și Tissue_HC_200_V7_DSP

Acest document este *Fișa de protocol QIAsymphony SP R3 Tissue_LC_200_V7_DSP și Tissue_HC_200_V7_DSP*, pentru QIAsymphony DSP DNA Mini Kit, versiunea 1.

Informații generale

QIAsymphony DSP DNA Kit este destinat utilizării pentru diagnostic in vitro.

Aceste protocoale sunt destinate purificării ADN-ului total din țesuturi și din țesuturile fixate în formol și înglobate în parafină (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE), utilizând QIAsymphony SP și QIAsymphony DSP DNA Mini Kit.

În funcție de tipul probei, recomandăm utilizarea protocolului cu conținut redus (Low Content, LC) sau cu conținut ridicat (High Content, HC). Țesuturile vor genera rezultate ADN crescute, atunci când sunt procesate prin protocolul cu conținut ridicat, dar protocolul cu conținut redus, în asociere cu un volum de eluție mic (50 μ l), poate fi utilizat dacă este necesară o concentrație ridicată de ADN. Pentru țesutul FFPE, recomandăm utilizarea protocolului cu conținut redus.

Protocol cu conținut redus

Kit	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (cat. nr. 937236)
Material de probă	Țesut FFPE și țesut* Într-un singur preparat pot fi combinate până la 4 secțiuni de țesut FFPE, fiecare cu o grosime de maximum 10 μ m, sau 8 secțiuni, cu o grosime de până la 5 μ m și o arie a suprafeței de maxim 250 mm ² .
Denumire protocol	Tissue_LC_200_V7_DSP
Set implicit de control al dozării	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volum de eluție	50 μ l, 100 μ l, 200 μ l sau 400 μ l
Versiune software necesară	Versiunea 4.0 sau mai recentă

* Consultați protocolul cu conținut ridicat pentru informații despre probele de țesut.

Protocol cu conținut ridicat

Kit	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (cat. nr. 937236)
Material de probă	Țesut Dacă nu sunt disponibile informații despre rezultatul preconizat, recomandăm să începeți cu 25 mg de material de probă. În funcție de rezultatul obținut, dimensiunea probei poate fi mărită în preparatele ulterioare.
Denumire protocol	Tissue_HC_200_V7_DSP
Set implicit de control al dozării	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volum de eluție	100 μ l, 200 μ l sau 400 μ l
Versiune software necesară	Versiunea 4.0 sau mai recentă

Materiale necesare, dar nefurnizate

Pentru toate tipurile de probe

- Soluție tampon ATL, 4 x 50 ml (cat. nr. 939016)
- Pentru reducerea la minimum a conținutului de ARN: RNază A fără DNază (soluție standard de 100 mg/ml)

Pentru țesutul FFPE (deparafinare fără xilen)

- Soluție de deparafinare (cat. nr. 939018)

Pentru țesutul FFPE (deparafinare cu utilizarea xilenului)

- Xilen (99–100%)
- Etanol (96–100%)*

Sertarul „Sample” (Probă)

Tip probă	Țesut FFPE și țesut
Voluim probă la introducere	220 μl (necesar pe probă, pe protocol) [†]
Voluim probă procesat	200 μl
Eprubete pentru probă primare	n/a
Eprubete pentru probă secundare	Consultați www.qiagen.com/goto/dsphandbooks pentru informații suplimentare.
Elemente de inserție	Depinde de tipul eprubetei pentru probă utilizat; pentru mai multe informații, consultați www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] Atât pentru protocolul cu conținut ridicat, cât și pentru protocolul cu conținut redus, sistemul nu va recunoaște dacă volumul probei este mai mic de 220 μl, deoarece transferul probei se face fără detecția nivelului de lichid. Prin urmare, asigurați-vă că volumul introdus al probei este de 220 μl.

n/a = nu se aplică.

Sertarul „Reagents and Consumables” (Reactivi și consumabile)

Poziția A1 și/sau A2	Cartuș cu reactivi
Poziția B1	n/a
Support al stativului pentru vârfuri 1–17	Vârfuri cu filtru de unică folosință, 200 μl sau 1500 μl
Support al cutiilor individuale 1–4	Cutii individuale care conțin cartușe pentru prepararea probelor sau învelișuri pentru 8 tije

n/a = nu se aplică.

* Nu utilizați alcool denaturat, care conține substanțe suplimentare, precum metanol sau metiletiletetonă.

Sertarul „Waste” (Deșeuri)

Support al cutiilor individuale 1–4	Cutii individuale goale
Support al pungilor pentru deșeuri	Pungă pentru deșeuri
Support al flaconului de deșeuri lichide	Flacon de deșeuri lichide gol

Sertarul „Eluate” (Eluat)

Stativ de eluție (recomandăm utilizarea fantei 1, poziție de răcire)	Consultați www.qiagen.com/goto/dsphandbooks pentru informații suplimentare.
--	---

Componente din plastic necesare

Componente din plastic	Un lot, 24 de probe*	Două loturi, 48 de probe*	Trei loturi, 72 de probe*	Patru loturi, 96 de probe*
Vârfuri cu filtru de unică folosință, 200 µl†	26	50	74	98
Vârfuri cu filtru de unică folosință, 1500 µl†	72	136	200	264
Cartușe de preparare a probei§	21	42	63	84
Învelișuri pentru 8 tije¹	3	6	9	12

* Utilizarea a mai puțin de 24 de probe pe lot scade numărul de vârfuri cu filtru de unică folosință necesar pentru fiecare testare.

† Există 32 de vârfuri cu filtru/stativ pentru vârfuri cu filtru.

‡ Numărul de vârfuri cu filtru necesare include vârfuri cu filtru pentru 1 scanare a inventarului pe cartuș cu reactivi.

§ Există 28 de cartușe de preparare a probei/cutie individuală.

¹ Există douăsprezece învelișuri pentru 8 tije/cutie individuală.

Notă: Numărul specificat de vârfuri cu filtru poate diferi de numărul afișat pe ecranul tactil, în funcție de setări. Recomandăm încărcarea unui număr maxim posibil de vârfuri.

Volum de eluție

Volumul de eluție este selectat pe ecranul tactil. În funcție de tipul probei și de conținutul de ADN, volumul de eluat final poate varia cu până la 15 µl mai puțin decât volumul selectat. Din cauza faptului că volumul de eluat poate varia, recomandăm verificarea volumului de eluat propriu-zis la utilizarea unui sistem automat de configurare a testelor care nu verifică volumul de eluat înaintea transferului. Eluția în volume mai mici mărește concentrația finală de ADN, dar reduce ușor rezultatul. Recomandăm utilizarea unui volum de eluție corespunzător pentru aplicația din aval dorită.

Prepararea probelor

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvate. Pentru informații suplimentare, consultați fișele cu date de siguranță (Safety Data Sheets, SDS) corespunzătoare, disponibile de la furnizorul produsului.

Informație importantă înainte de a începe

- Particulele magnetice QIASymphony copurifică ARN-ul și ADN-ul, dacă ambele sunt prezente în probă. Pentru a reduce la minimum conținutul de ARN din probă, adăugați RNază A în probă la pasul indicat în protocolul de tratare prealabilă respectiv.

Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Verificați soluția tampon ATL pentru prezența unui precipitat alb. Dacă este necesar, incubați timp de 30 de minute la 37 °C, agitând ocazional pentru dizolvarea precipitatului.
- Setați un ThermoMixer® sau un agitator-incubator la temperatura necesară pentru tratarea prealabilă respectivă.*

Țesuturi

Țesutul proaspăt și cel congelat pot fi folosite pentru purificarea ADN. Rezultatul și calitatea ADN-ului vor depinde de tipul, sursa și condițiile de depozitare a țesuturilor. Țesutul proaspăt poate fi tăiat în bucăți mici și depozitat la -20 °C sau la -80 °C înainte de procesare. În general, recomandăm utilizarea protocolului cu conținut ridicat, care va oferi rezultate ADN îmbunătățite. Protocolul cu conținut redus, în asociere cu volumul de eluție de 50 μl, este recomandat doar dacă sunt necesare concentrații mari de ADN pentru analiza din aval. Dacă nu sunt disponibile informații cu privire la rezultatul preconizat, recomandăm să începeți cu 25 mg de material de probă, folosind protocolul cu conținut ridicat și volumul de eluție de 200 μl. În funcție de rezultatul obținut, dimensiunea probei poate fi mărită sau volumul de eluție poate fi redus în preparatele ulterioare. Rețineți că supraîncărcarea preparatelor în asociere cu volume de eluție mici poate provoca transferul particulelor magnetice în eluat, care ar putea compromite puritatea ADN-ului și analiza din aval.

* Asigurați-vă să instrumentele au fost verificate, întreținute și calibrate cu regularitate, conform cu instrucțiunile producătorului.

Protocol de tratare prealabilă pentru țesut

1. Transferați proba de țesut într-un tub de microcentrifugare de 2 ml (nefurnizat).
2. Adăugați 220 μl de soluție tampon ATL.
3. Adăugați 20 μl de proteinază K și amestecați prin „ciocănirea” tubului.

Notă: Utilizați proteinază K din stativul pentru enzime al QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Introduceți tubul într-un ThermoMixer sau într-un agitator-incubator, și incubați la 56 °C, agitând la 900 rot/min, până când țesutul este complet lizat.

Notă: Timpul de lizare variază în funcție de tipul țesutului procesat. Pentru cele mai multe țesuturi, liza este finalizată în 3 ore. Dacă liza este incompletă după 3 ore, lucru indicat de prezența materialului insolubil sau de lizați cu viscozitate extrem de mare, timpul de lizare poate fi prelungit, sau materialul insolubil poate fi eliminat prin centrifugare, conform descrierii de la pasul 6. Este posibilă lizarea peste noapte, fără ca aceasta să afecteze preparatul.

5. Pentru a reduce la minimum conținutul de ARN din probă, adăugați 4 μl de RNază A (100 mg/ml) și incubați timp de 2 minute la temperatura camerei (15–25 °C) înainte de a continua cu pasul 6.
6. Omogenizați proba prin pipetare verticală, de mai multe ori.

Notă: Dacă încă sunt prezente bucăți de material insolubil, centrifugați la 3000 x g timp de 1 minut.

7. Transferați cu atenție 220 μl de lichid supernatant în eprubetele pentru probă, care sunt compatibile cu suportul pentru probe aferent QIASymphony SP.

Pentru o listă completă de eprubete pentru probă compatibile, consultați www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomandăm utilizarea eprubetelor de 2 ml (de exemplu, Sarstedt® cat. nr. 72.693 sau 72.608).

Țesut FFPE

Procedurile standard de fixare în formol și înglobare în parafină au întotdeauna ca rezultat o fragmentare semnificativă a acizilor nucleici. Pentru a limita gradul de fragmentare a ADN-ului, luați următoarele măsuri:

- Fixați probele de țesut în 4–10% formol cât se poate de repede după rezecția chirurgicală
- Folosiți un timp de fixare de 14–24 de ore (timpii de fixare mai mari au ca rezultat o fragmentare mai mare a ADN-ului, rezultând o performanță slabă în testele din aval)
- Deshidratați bine probele înainte de înglobare (formolul rezidual poate inhiba digerarea proteinazei K)

Materialul inițial pentru purificarea ADN trebuie să fie secțiuni proaspăt tăiate de țesut FFPE. Într-un singur preparat pot fi procesate până la 4 secțiuni, fiecare cu o grosime de maximum 10 μm, sau 8 secțiuni, cu o grosime de până la 5 μm și o arie a suprafeței de maximum 250 mm². Dacă nu sunt disponibile informații despre natura materialului inițial, recomandăm să începeți cu maximum 3 secțiuni într-un singur preparat. În funcție de rezultatul și de puritatea ADN-ului, poate fi posibilă utilizarea a maximum 8 secțiuni în preparatele ulterioare.

Notă: Protocoalele pentru țesuturile FFPE sunt concepute special pentru a copurifica doar cantități mici de ARN. Aceasta va avea ca rezultat o valoare redusă a măsurătorii fotometrice în comparație cu valorile obținute cu kitul manual QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue.

Protocol de tratare prealabilă pentru țesut FFPE

Metoda 1: deparafinare folosind Soluție de deparafinare

1. Utilizând un bisturiu, tăiați parafina în exces din blocul de probă.
2. Tăiați maximum 4 secțiuni cu grosimea de 10 μm sau maximum 8 secțiuni cu grosimea de 5 μm.

Notă: Dacă suprafața probei a fost expusă la aer, aruncați primele 2–3 secțiuni.

3. Introduceți imediat secțiunile într-un tub Sarstedt de 2 ml (nefurnizat, cat. nr. 72.693 sau 72.608), compatibil cu suportul pentru probe aferent QIASymphony SP.
4. Adăugați 200 μl de soluție tampon ATL în secțiuni.
5. Adăugați 20 μl de proteinază K.

Notă: Utilizați proteinază K din stativul pentru enzime al QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

6. Adăugați 160 μl sau 320 μl de Soluție de deparafinare (consultați tabelul de mai jos) și amestecați în agitatorul vortex.

Grosimea secțiunilor	Număr de secțiuni	Volum de Soluție de deparafinare
5 μm	1-4	160 μl
	5-8	320 μl
10 μm	1-2	160 μl
	3-4	320 μl

7. Introduceți tubul într-un ThermoMixer sau într-un agitator-incubator, și incubați la 56 °C timp de 1 oră, agitând la 1000 rot/min, până când țesutul este complet lizat.

Notă: Timpul de lizare variază în funcție de tipul țesutului procesat. Pentru cele mai multe țesuturi, liza este finalizată în 1 oră. Dacă liza este incompletă după 1 oră, lucru indicat de prezența materialului insolubil, timpul de lizare poate fi prelungit sau materialul insolubil

poate fi floclat prin centrifugare, conform descrierii de la pasul 10. Este posibilă lizarea peste noapte, fără ca aceasta să afecteze preparatul.

8. Incubați la 90 °C timp de 1 oră.

Notă: Incubarea la 90 °C în soluție tampon ATL inversează parțial modificarea în formaldehidă a acizilor nucleici. Timpii de incubare mai mari sau temperaturile de incubare mai ridicate pot avea ca rezultat un ADN mai fragmentat. Dacă utilizați un singur bloc de încălzire, lăsați proba la temperatura camerei după incubarea acesteia la 56 °C, până când blocul de încălzire ajunge la 90 °C.

9. Pentru a reduce la minimum conținutul de ARN din probă, adăugați 2 μl de RNază A (100 mg/ml) în faza inferioară și incubați timp de 2 minute la temperatura camerei înainte de a continua cu pasul 10. Lăsați proba să se răcească la temperatura camerei, înainte de a adăuga RNază A.
10. Centrifugați la turație maximă timp de 1 minut la temperatura camerei.
11. Transferați cu atenție eprubetele (care conțin ambele faze) în suportul pentru probe aferent QIASymphony SP.

Metoda 2: deparafinare folosind xilen

1. Utilizând un bisturiu, tăiați parafina în exces din blocul de probă.
2. Tăiați maximum 4 secțiuni cu grosimea de 10 μm sau maximum 8 secțiuni cu grosimea de 5 μm.
Notă: Dacă suprafața probei a fost expusă la aer, aruncați primele 2–3 secțiuni.
3. Introduceți imediat secțiunile într-un tub de microcentrifugare de 1,5 sau 2 ml (nefurnizat) și adăugați 1 ml de xilen în probă. Închideți capacul și agitați puternic timp de 10 secunde.
4. Centrifugați la turație maximă timp de 2 minute la temperatura camerei.
5. Eliminați lichidul supernatant prin pipetare. Nu scoateți niciun pelet.
6. Adăugați 1 ml de etanol (96–100%) în pelet și amestecați în agitatorul vortex.
Notă: Etanolul extrage xilenul rezidual din probă.
7. Centrifugați la turație maximă timp de 2 minute la temperatura camerei.
8. Eliminați lichidul supernatant prin pipetare. Nu scoateți niciun pelet.
Notă: Scoateți cu atenție etanolul rezidual, utilizând un vârful de pipetă fin.
9. Deschideți tubul și incubați la temperatura camerei (15–25 °C) timp de 10 minute sau până la evaporarea întregului etanol rezidual.
Notă: Incubarea poate fi realizată la temperaturi de până la 37 °C.
10. Resuspendați peletul în 220 μl de soluție tampon ATL.
11. Adăugați 20 μl de proteinază K și amestecați în agitatorul vortex.

Notă: Utilizați proteinază K din stativul pentru enzime al QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

12. Incubați la 56 °C timp de 1 oră (sau până la lizarea completă a probei).

Notă: Timpul de lizare variază în funcție de tipul țesutului procesat. Pentru cele mai multe țesuturi, liza este finalizată în 1 oră. Dacă liza este incompletă după 1 oră, lucru indicat de prezența materialului insolubil, timpul de lizare poate fi prelungit sau materialul insolubil poate fi eliminat prin centrifugare, conform descrierii de la pasul 16. Este posibilă lizarea peste noapte, fără ca aceasta să afecteze preparatul.

13. Incubați la 90 °C timp de 1 oră.

Notă: Incubarea la 90 °C în soluție tampon ATL inversează parțial modificarea în formaldehidă a acizilor nucleici. Timpii de incubare mai mari sau temperaturile de incubare mai ridicate pot avea ca rezultat un ADN mai fragmentat. Dacă utilizați un singur bloc de încălzire, lăsați proba la temperatura camerei după incubarea acesteia la 56 °C, până când blocul de încălzire ajunge la 90 °C.

14. Centrifugați pentru scurt timp proba pentru a elimina picăturile din interiorul capacului.

15. Pentru a reduce la minimum conținutul de ARN din probă, adăugați 2 μl de RNază A (100 mg/ml) și incubați timp de 2 minute la temperatura camerei înainte de a continua cu pasul 16. Lăsați proba să se răcească la temperatura camerei, înainte de a adăuga RNază A.

16. Transferați cu atenție 220 μl de lizat în eprubetele pentru probă, care sunt compatibile cu suportul pentru probe aferent QIASymphony SP.

Notă: Dacă lizații conțin material nedigerat, centrifugați la turație maximă timp de 2 minute la temperatura camerei, înainte de transferul lichidului supernatant în eprubetele pentru probă. Pentru o listă completă de eprubete pentru probă compatibile, consultați www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomandăm utilizarea eprubetelor de 2 ml (de exemplu, Sarstedt cat. nr. 72.693 sau 72.608).

Istoricul revizuirilor

Istoricul revizuirilor documentului	
R3 12/2017	Actualizare pentru software-ul QIASymphony versiunea 5.0

Pentru informații actualizate privind licențele și clauzele de declinare a răspunderii specifice produselor, consultați ghidul sau manualul de utilizare al kitului QIAGEN® respectiv. Ghidurile și manualele de utilizare pentru kit-urile QIAGEN sunt disponibile pe www.qiagen.com sau pot fi solicitate de la Serviciul tehnic QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

Mărci comerciale: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Denumirile înregistrate, mărcile comerciale etc. utilizate în documentul de față, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific, sunt protejate prin lege.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

Pentru comenzi www.qiagen.com/shop | Suport tehnic support.qiagen.com | Site web www.qiagen.com