

Febbraio 2023

Istruzioni per l'uso (manuale) del QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit



50

Versione 2



Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Numero di catalogo



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA



1130780IT

Indice

Uso previsto	4
Utente previsto.....	4
Descrizione e principio	5
Sommaro e spiegazioni.....	5
Principio della procedura.....	5
Materiali in dotazione.....	7
Contenuto del kit.....	7
Componenti del kit	8
Materiale necessario ma non in dotazione	9
Reagenti aggiuntivi.....	9
Materiali di consumo	9
Strumentazione	9
Avvertenze e precauzioni	10
Informazioni sulla sicurezza	10
Informazioni di emergenza	11
Precauzioni	11
Smaltimento	12
Conservazione e manipolazione dei reagenti	13
Stabilità durante l'uso	13
Conservazione e manipolazione dei campioni.....	14
Procedura.....	15
Protocollo: Isolamento del DNA genomico da sezioni di tessuto FFPE.....	21

Controllo di qualità.....	25
Limitazioni	26
Caratteristiche delle prestazioni	27
Guida alla risoluzione dei problemi	28
Simboli.....	30
Appendice: Manipolazione	33
Informazioni per gli ordini	34
Cronologia delle revisioni del documento.....	35

Uso previsto

Il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione di DNA genomico da campioni biologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

È destinato a scopi di preparazione manuale dei campioni e non fornisce alcun risultato clinico, qualitativo o quantitativo.

Utente previsto

Questo prodotto è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti in tecniche di biologia molecolare per scopi di diagnostica in vitro (IVD).

Descrizione e principio

Sommario e spiegazioni

Il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit è utilizzato per la purificazione di DNA da sezioni di tessuto FFPE. Utilizza la comprovata microtecnologia QIAamp DNA per la purificazione di DNA genomico e mitocondriale da campioni di piccoli volumi o ridotte dimensioni. Il kit combina le proprietà di legame selettivo della membrana a base di silice con volumi di eluizione flessibili.

Le condizioni di lisi consentono di purificare efficacemente il DNA genomico dalle sezioni di tessuto FFPE senza il bisogno di sottoporli a incubazione per una notte. L'incubazione a temperatura elevata dopo la digestione mediante proteinasi K rimuove parzialmente il legame crociato della formalina con il DNA rilasciato, migliorando potenzialmente la resa e le prestazioni del DNA negli esami downstream. Si osservi che il DNA isolato da campioni FFPE ha generalmente un peso molecolare inferiore rispetto al DNA proveniente da campioni freschi o congelati. Il grado di frammentazione dipende da tipo ed età del campione e dalle condizioni utilizzate per la fissazione.

Dopo la lisi del campione, la semplice procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit è indicata per il trattamento simultaneo di più campioni.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno degli studi di valutazione delle prestazioni di QIAGEN® descritti nel manuale.

Principio della procedura

La procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit è costituita da sei fasi (Figura 1):

- Rimozione della paraffina: la paraffina viene disciolta in xilene e rimossa.
- Lisi: il campione viene lisato a 56°C in condizioni di denaturazione con proteinasi K.

- Riscaldamento: l'incubazione a 90°C inverte i legami crociati della formalina.
- Legame: il DNA si lega alla membrana e i contaminanti la attraversano.
- Lavaggio: i contaminanti residui vengono rimossi mediante lavaggio.
- Eluizione: il DNA puro concentrato viene eluito dalla membrana.

Procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

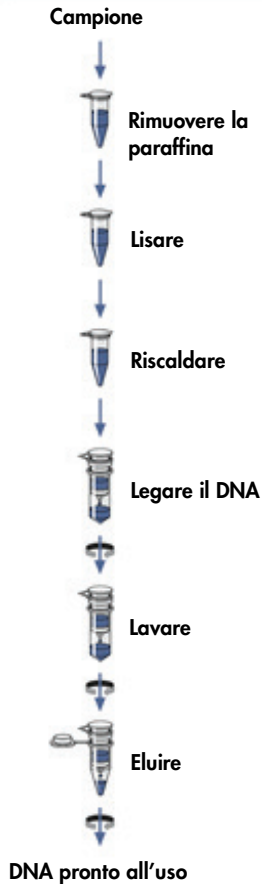

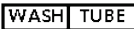
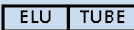
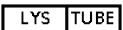


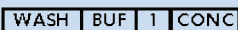

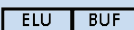




Figura 1. Procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	(50)
Numero di catalogo	60404
Numero di preparazioni	50

	Identità	Simboli	Quantità
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute Columns con provette di lavaggio)		50
WT	Wash Tubes (Provette di lavaggio) (2 ml)		3 x 50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (2 ml)		50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Tampone di lisi dei tessuti)		10 ml
AL	Lysis Buffer* (Tampone di lisi)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Tampone di lavaggio 1) (concentrato)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tampone di lavaggio 2) (concentrato)		13 ml
ATE	Elution Buffer† (Tampone di eluizione)		12 ml
PK	Proteinase K (Proteinasi K)		1,25 ml
-	Istruzioni per l'uso (manuale)		1

* Contiene sale di guanidina. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Vedere pagina 10 per Avvertenze e precauzioni.

† Contiene azide di sodio come conservante.

Componenti del kit

I principali componenti del kit sono illustrati di seguito.

Tabella 1. Principi attivi nei reagenti forniti

Reagente		Principi/o attivi/o	Concentrazione (w/w) [%]
Simbolo	Nome		
ATL	Buffer ATL	Sodio dodecil solfato	tra ≥ 1 e < 10
AL	Buffer AL	Guanidina cloridrato Acido maleico	tra > 30 e < 50 tra $\geq 0,1$ e < 1
AW1	Buffer AW1	Guanidina cloridrato Etanolo	tra ≥ 50 e < 70 tra ≥ 10 a < 90
AW2	Buffer AW2	Etanolo	tra ≥ 10 e < 90
ATE	Buffer ATE	Nessuno	-
PK	Proteinase K (Proteinasi K)	Proteinasi K	tra ≥ 1 e < 10

Per ridurre al minimo il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici ottenuti in seguito all'isolamento del DNA è necessario ricorrere ad appropriati controlli delle applicazioni a valle.

Materiale necessario ma non in dotazione

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Reagenti aggiuntivi

- Xilene
- Etanolo (96-100%)*

Materiali di consumo

- Se si decide di non utilizzare le provette fornite nel kit, si raccomanda di utilizzare provette per microcentrifuga da 1,5 ml o 2 mL (per le fasi di lisi) e provette per microcentrifuga da 1,5 mL (per le fasi di eluizione) (disponibili ad es. presso Sarstedt®, N. cat. 72.690). Si raccomanda l'utilizzo di provette prive di DNasi/RNasi, di forma conica e con coperchi di sicurezza. È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.
- Pipette e relativi puntali (per impedire la contaminazione crociata, si raccomanda fortemente di utilizzare puntali per pipette con barriera aerosol anticontaminazione)

Strumentazione†

- Termomiscelatore‡, incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, blocco riscaldante o bagno d'acqua che consenta l'incubazione a 56°C, 70°C e 90°C
- Microcentrifuga† con rotore per provette da 2 ml
- Agitatore Vortex

* Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

† Prima dell'uso, assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

‡ Nelle procedure QIAamp DSP DNA FFPE, per garantire che i campioni siano trattati nel modo corretto, si consiglia fortemente di calibrare gli strumenti secondo le raccomandazioni del fabbricante.

Avvertenze e precauzioni

In base alla gestione del rischio di QIAGEN, tutte le misure di controllo del rischio previste sono state implementate nella progettazione del prodotto. Il rischio residuo complessivo è considerato accettabile e l'uso del dispositivo è ritenuto sicuro. Questo manuale contiene istruzioni, avvertenze e precauzioni per garantire la sicurezza e le prestazioni del dispositivo. Queste devono essere seguite rigorosamente.

Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS sono disponibili in formato PDF online all'indirizzo www.qiagen.com/safety, dove è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

CAUTELE



NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.

- Il Buffer AL e il Buffer AW1 contengono guanidina cloridrato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina.
- In caso di fuoriuscita di un liquido contenente questi tamponi, pulire con acqua e un detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire l'area interessata prima con acqua e un detergente da laboratorio, quindi con ipoclorito di sodio 1% (v/v).

- I campioni sono potenzialmente infettivi. Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

Informazioni di emergenza

CHEMTREC

USA e Canada 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada +1 703-527-3887

Precauzioni

Buffer AL



Contiene: guanidina cloridrato e acido maleico. Avvertenza Può essere nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Può provocare una reazione allergica cutanea. Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. **IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE:** lavare abbondantemente con acqua e sapone. In caso di irritazione cutanea: consultare un medico. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia.

Buffer ATL



Avvertenza Causa lieve irritazione cutanea. In caso di irritazione cutanea: consultare un medico.

Buffer AW1



Contiene guanidina cloridrato. Avvertenza Nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. In caso di malore, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia.

Proteinase K



Contiene: Proteinasi K. Pericolo! Causa lieve irritazione cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti. Se si manifestano sintomi respiratori: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **IN CASO DI INALAZIONE:** In caso di difficoltà respiratorie, portare la vittima all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione. Indossare una protezione per la respirazione.

Smaltimento

I materiali di scarto contengono campioni e reagenti. Tali materiali di scarto possono contenere materiali tossici o infettivi, pertanto devono essere opportunamente smaltiti. Consultare le normative di sicurezza locali per le corrette procedure di smaltimento.

Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS in formato PDF sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile reperire, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Le QIAamp MinElute Columns devono essere conservate a 2–8°C al momento della consegna e possono essere utilizzate fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C) e sono stabili fino alla data di scadenza del kit, se nella confezione originale.

Stabilità durante l'uso

I Buffer AW1 e AW2 ricostituiti possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C) per un massimo di 1 anno o fino alla data di scadenza del kit, se precedente.

Conservazione e manipolazione dei campioni

Il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit è stato sviluppato per l'uso con campioni FFPE.

La stabilità del DNA dipende da vari fattori, quali il prelievo, la manipolazione, la preparazione e le condizioni di conservazione dei campioni, che possono influire sull'utilizzo nell'applicazione downstream. È importante consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream e/o verificare e convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni appropriate.

Per informazioni generali sulle procedure di laboratorio per la raccolta, la manipolazione, la preparazione e le condizioni di conservazione dei campioni FFPE, consultare la norma ISO 20166-3:2018 "Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue - Part 3: Isolated DNA" e la norma CLSI MM13-A "Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline".

Il DNA viene eluito in Buffer ATE ed è immediatamente pronto per l'uso in reazioni di amplificazione o per la conservazione (in condizioni che dipendono dai requisiti dell'utente). Per le condizioni di conservazione raccomandate per specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit pertinenti.

Procedura

Punti importanti prima di iniziare

- Tutti i reagenti forniti nel QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Se si desidera mantenere un livello di prestazioni ottimale, non sostituire nessuno dei reagenti del kit.
- Dopo la ricezione, verificare che i componenti del kit non siano danneggiati. Se le confezioni o i flaconi di tampone sono danneggiati, rivolgersi ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale. In caso di fuoriuscita di liquidi, fare riferimento a "Avvertenze e precauzioni", pagina 10. Non utilizzare componenti del kit danneggiati, poiché potrebbero limitare il rendimento del kit.
- Non utilizzare contemporaneamente componenti di più kit per la stessa procedura, a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto nelle pratiche di laboratorio per la diagnostica in vitro.
- Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni per evitare la contaminazione dovuta alla superficie della pelle o alla polvere presente sulle apparecchiature di laboratorio. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono comuni fonti di contaminazione. Cambiare spesso i guanti e tenere chiuse le provette.
- I tamponi inutilizzati, i flow-through e i residui di campione devono essere smaltiti secondo le procedure locali.
- Se si utilizza materiale proprio in plastica, si raccomanda l'uso di provette a fondo conico monouso in polipropilene, a basso legame, prive di DNasi/RNasi, da 1,5-2 ml, dotate di coperchi di sicurezza durante l'intera procedura di purificazione.
- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione a temperatura ambiente (15-25°C).

- Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15-25°C) e devono essere mescolati accuratamente prima dell'uso.
- Impostare un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato a 56°C per utilizzarlo nella fase 9. Se non si ha a disposizione un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, è possibile utilizzare in alternativa un blocco riscaldante o un bagno d'acqua.
- Se il Buffer AL o il Buffer ATL contengono del precipitato, scioglierlo riscaldandoli a 70°C e agitando delicatamente.
- Assicurarsi che il Buffer AW1 e il Buffer AW2 siano stati preparati secondo le istruzioni riportate di seguito.
- Le procedure di controllo qualità di QIAGEN comprendono l'esecuzione di test funzionali per il rilascio dei kit condotti sui singoli lotti di kit. Pertanto, non miscelare reagenti appartenenti a lotti di kit diversi e non unire singoli reagenti provenienti da lotti di reagenti diversi.

Preparazione dei tamponi

Preparazione del Buffer ATL

- Prima di iniziare la procedura, verificare se nel Buffer ATL si è formato del precipitato. Se necessario, scioglierlo riscaldando il tampone a 70°C e agitandolo delicatamente.

Preparazione del Buffer AL

- Prima di iniziare la procedura, verificare se nel Buffer AL si è formato del precipitato. Se necessario, scioglierlo riscaldando il tampone a 70°C e agitandolo delicatamente.

Preparazione del Buffer AW1

- Aggiungere 25 ml di etanolo (96–100%)* al flacone contenente 19 ml di Buffer AW1 concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Il Buffer AW1 ricostituito può essere conservato a temperatura ambiente (15–25°C) per un massimo di 1 anno o fino alla data di scadenza del kit, se precedente. Si raccomanda di annotare la data di ricostituzione sull'etichetta del tampone.

Nota: prima di iniziare la procedura, mescolare il Buffer AW1 ricostituito scuotendolo.

Preparazione del Buffer AW2

- Aggiungere 30 ml di etanolo (96–100%)* al flacone contenente 13 ml di Buffer AW2 concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Il Buffer AW2 ricostituito può essere conservato a temperatura ambiente (15–25°C) per un massimo di 1 anno o fino alla data di scadenza del kit, se precedente. Si raccomanda di annotare la data di ricostituzione sull'etichetta del tampone.

Nota: prima di iniziare la procedura, mescolare il Buffer AW2 ricostituito scuotendolo.

Materiale di partenza

Il materiale di partenza per la purificazione del DNA è costituito da sezioni di tessuto FFPE (idealmente appena recise). È possibile combinare più sezioni di tessuti in 1 preparazione. Se non si possiedono informazioni sulla natura del materiale di partenza, si consiglia di iniziare con non più di tre sezioni per preparazione.

L'utente deve ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per ogni procedura utilizzata nel proprio laboratorio. Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN a valle, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni.

* Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilcheton (MEK).

Procedura di manipolazione per evitare la contaminazione crociata

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, per evitare la contaminazione crociata tra i campioni, è necessario osservare le precauzioni per la manipolazione delle QIAamp MinElute Columns riportate di seguito.

- Non riempire eccessivamente le provette con i tessuti.
- Quando si raschiano i tessuti, cambiare il bisturi tra un campione e l'altro.
- Applicare con cura il campione o la soluzione alla QIAamp MinElute Column. Pipettare il campione nella QIAamp MinElute Column senza bagnare il bordo della colonna.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Si raccomanda di utilizzare puntali per pipette con barriera aerosol anticontaminazione.
- Nelle fasi di lavaggio del campione, utilizzare sempre nuove provette di lavaggio.
- Assicurarsi che i coperchi delle provette siano perfettamente chiusi prima di sottoporle alla miscelazione con agitatore Vortex o alla centrifugazione.
- Assicurarsi che la QIAamp MinElute Column sia chiusa perfettamente prima di centrifugare.
- Dopo tutte le fasi di centrifugazione con agitatore Vortex a pulsazione e le fasi di incubazione a 90°C, centrifugare brevemente le provette per microcentrifuga per eliminare le gocce dall'interno dei coperchi.
- Aprire soltanto 1 QIAamp MinElute Column per volta, facendo attenzione a non generare aerosol.
- Cambiare sempre il bisturi tra un campione e l'altro.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Per minimizzare il rischio di contaminazione crociata, si consiglia di utilizzare puntali per pipette con barriera aerosol anticontaminazione e di evitare l'utilizzo di pipette multistep.
- Utilizzare sempre guanti monouso e controllare regolarmente che non siano stati contaminati da materiale proveniente dai campioni. Se si sospetta che i guanti siano stati contaminati, gettarli.
- Aprire soltanto 1 provetta alla volta.

Centrifugazione

Le QIAamp MinElute Columns possono essere inserite nella maggior parte delle provette per microcentrifuga standard da 1,5-2 ml. La centrifugazione delle QIAamp MinElute Columns viene eseguita a circa 6000 x g per ridurre la rumorosità. La centrifugazione a massima velocità non migliora la resa del DNA. Tuttavia, la centrifugazione delle QIAamp MinElute Columns a massima velocità è richiesta in 2 fasi della procedura: la fase di centrifugazione a secco dopo il lavaggio delle membrane e la fase di eluizione. La centrifugazione alla massima velocità è richiesta inoltre per far scendere il campione dalle pareti dopo la fase del trattamento con xilene e del lavaggio con etanolo.

Tutte le fasi di centrifugazione devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C). Una bassa temperatura di centrifugazione può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale.

Trattamento delle QIAamp MinElute Columns in una microcentrifuga

- Chiudere sempre le QIAamp MinElute Columns prima di collocarle nella microcentrifuga.
- Evitare di toccare la membrana della QIAamp MinElute Column con il puntale per pipetta.
- Le frazioni di flow-through possono contenere rifiuti pericolosi e devono essere smaltite in modo adeguato.
- Per trattare in modo efficiente più campioni in parallelo, si consiglia di riempire un rack con provette di lavaggio in cui poter trasferire le QIAamp MinElute Columns dopo la centrifugazione. Le provette di lavaggio usate contenenti il flow-through possono essere gettate e le nuove, contenenti le QIAamp MinElute Columns, collocate direttamente nella microcentrifuga.
- Prestare attenzione a mantenere sempre la tracciabilità dei campioni durante l'intero processo.

Eluizione del DNA purificato

Per le applicazioni a valle che richiedono piccoli volumi di partenza (per esempio alcuni esami PCR), un eluito più concentrato può migliorare la sensibilità dell'esame ma può altresì comportare un aumento della concentrazione di potenziali inibitori.

Un aumento del volume di eluizione comporta la diminuzione della concentrazione del DNA nell'eluito.

Il volume di eluito recuperato può essere inferiore di circa 5 µl rispetto al volume del Buffer ATE applicato alla QIAamp MinElute Column. Per esempio, da un volume di eluizione di 20 µl si ottiene un volume ≥ 15 µl di eluito. Il volume dell'eluito ottenuto dipende dalla natura del campione.

È responsabilità dell'utente ottimizzare il volume di eluizione per qualsiasi procedura utilizzata nel proprio laboratorio. Per i volumi di eluizione raccomandati per specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit.

La resa può essere aumentata se la colonna è incubata con il Buffer ATE a temperatura ambiente per esempio per un tempo di 5 minuti prima della centrifugazione. Il DNA eluito può essere raccolto in provette di eluizione da 1,5 ml (in dotazione). Le condizioni di conservazione per il DNA eluito dipendono dai requisiti definiti dall'utente. Per le condizioni di conservazione raccomandate per specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit.

Protocollo: Isolamento del DNA genomico da sezioni di tessuto FFPE

Procedura

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocchetto del campione.
2. Praticare delle sezioni attenendosi alle procedure standard di laboratorio (vedere "Materiale di partenza", pagina 17). L'utente deve ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per ogni procedura utilizzata nel proprio laboratorio. Prestare attenzione a mantenere sempre la tracciabilità dei campioni durante l'intero processo.
3. Raschiare immediatamente il tessuto dalle sezioni utilizzando un bisturi sterile in una provetta di lisi (in dotazione). Assicurarsi che tutto il tessuto disponibile sia stato inserito nella provetta. Aggiungere al campione 1 mL di xilene, chiudere il coperchio e miscelare vigorosamente con agitatore Vortex fino a dissoluzione della paraffina (ad es. 10 secondi). Assicurarsi che la provetta sia perfettamente chiusa per evitare fuoriuscite di xilene, contaminazione crociata tra i campioni e l'eventuale contatto con lo xilene.
Nota: utilizzare lo xilene in una cappa di aspirazione o altro apparato di contenimento opportuno.
4. Centrifugare alla massima velocità per circa 2 minuti a temperatura ambiente per raccogliere il pellet di tessuto. Se non si è formato alcun pellet di tessuto, ripetere questa fase.
Nota: una bassa temperatura di centrifugazione può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale.
5. Rimuovere ed eliminare il supernatante con una pipetta. Conservare il pellet.
Il supernatante contiene xilene, che è un rifiuto pericoloso e deve essere opportunamente smaltito secondo le normative locali.
6. Aggiungere 1 ml di etanolo (96-100%) al pellet e miscelare accuratamente mediante agitatore Vortex.

L'etanolo estrae lo xilene residuo dal campione e deve essere smaltito in modo opportuno.

7. Centrifugare a massima velocità per circa 2 minuti a temperatura ambiente.

Rimuovere delicatamente il supernatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet. Rimuovere con cautela l'etanolo residuo con un puntale per pipetta sottile. Aprire la provetta e incubare a 15-40°C finché tutto l'etanolo residuo non è evaporato. La rimozione dell'etanolo residuo è fondamentale per la riuscita dell'estrazione.

Nota: una temperatura di incubazione più bassa rallenta l'evaporazione, mentre una temperatura più alta può seccare eccessivamente il pellet rendendone difficile la sospensione.

8. Risospendere il pellet in 180 µl di Buffer ATL. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare mediante agitatore Vortex.

Nota: il pellet deve essere rimesso opportunamente in sospensione nel Buffer ATL per garantire la massima resa nel recupero.

9. Incubare a 56°C per circa 1 ora (oppure finché il campione non è completamente lisato).

10. Incubare a 90°C per 1 ora.

L'incubazione a 90°C in Buffer ATL inverte parzialmente la modifica degli acidi nucleici da parte della formaldeide. Minori tempi di incubazione o temperature di incubazione inferiori possono avere effetti sulla qualità e la quantità del DNA. Se si utilizza soltanto 1 blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.

11. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del tappo.

12. Aggiungere 200 µl di Buffer AL al campione e mescolare accuratamente mediante agitatore Vortex. Quindi aggiungere 200 µl di etanolo (96-100%) e mescolare di nuovo accuratamente mediante agitatore Vortex.

È essenziale che il campione, il Buffer AL e l'etanolo vengano miscelati immediatamente e accuratamente mediante agitatore Vortex o utilizzando una pipetta per ottenere una soluzione omogenea. Il Buffer AL e l'etanolo possono essere premiscelati e quindi aggiunti insieme in 1 fase per risparmiare tempo quando si trattano più campioni. Al momento dell'aggiunta del Buffer AL e dell'etanolo può formarsi un precipitato di colore bianco. Questo precipitato non interferisce con la procedura QIAamp. Utilizzare sempre una miscela appena preparata e gettarla immediatamente dopo l'uso.

13. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del tappo.
14. Trasferire con attenzione l'intero lisato nella QIAamp MinElute Column (in una provetta di raccolta da 2 ml) senza bagnare il bordo, chiudere il coperchio, quindi centrifugare a 6000 x g per un tempo ≥ 1 minuto. Collocare la QIAamp MinElute Column in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml (in dotazione) e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through.

Se il lisato non è ancora passato completamente attraverso la membrana dopo la centrifugazione, centrifugare di nuovo a velocità più elevata fino a che la QIAamp MinElute Column non sia vuota.

15. Aprire con cautela la QIAamp MinElute Column e aggiungere 500 μ l di Buffer AW1 ricostituito senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a 6000 x g per un tempo ≥ 1 minuto. Collocare la QIAamp MinElute Column in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through.
16. Aprire con cautela la QIAamp MinElute Column e aggiungere 500 μ l di Buffer AW2 ricostituito senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a 6000 x g per un tempo ≥ 1 min. Collocare la QIAamp MinElute Column in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through.

Occorre evitare che la QIAamp MinElute Column e il flow-through entrino in contatto. Assicurarsi di bilanciare il rotore della centrifuga. Alcuni rotori di centrifuga possono vibrare in fase di decelerazione, facendo sì che il flow-through, contenente etanolo, entri in contatto con la QIAamp MinElute Column. Quando si rimuovono la QIAamp MinElute Column e la provetta di lavaggio dal rotore, prestare attenzione che il flow-through non entri in contatto con la QIAamp MinElute Column.

17. Centrifugare alla velocità massima (circa 20.000 x g) per circa 3 minuti per asciugare la membrana.

Il carryover di etanolo nell'eluato può interferire con le applicazioni a valle.

18. Inserire la QIAamp MinElute Column in una provetta di eluizione pulita (in dotazione) da 1,5 mL e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through. Aprire con cautela il coperchio della QIAamp MinElute Column e aggiungere 20-200 µl di Buffer ATE nel centro della membrana.

Importante: Se si utilizzano piccoli volumi di eluizione (<50 µl), applicare il Buffer ATE nel centro della membrana per garantire l'eluizione completa del DNA legato. Le QIAamp MinElute Columns offrono flessibilità nella scelta del volume di eluizione. Scegliere il volume sulla base dei requisiti dell'applicazione a valle. Il volume di eluito è inferiore di circa 5 µl rispetto al volume della soluzione di eluizione applicata alla colonna.

19. Chiudere il coperchio e incubare a temperatura ambiente (15–25°C) per 1 minuto. Centrifugare alla massima velocità (circa 20.000 x g) per ≥1 minuto.

L'incubazione della QIAamp MinElute Column, caricata con il Buffer ATE, per circa 5 minuti a temperatura ambiente prima della centrifugazione può aumentare la resa del DNA.

Controllo di qualità

In conformità al Sistema di gestione della qualità certificato da ISO di QIAGEN, ogni lotto di kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue viene testato rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Le prestazioni del kit sono state determinate mediante l'uso di tessuto FFPE per l'isolamento del DNA genomico.

Una fissazione insufficiente o eccessiva può influire sulla qualità del DNA, con conseguenti scarse prestazioni negli esami downstream.

La formalina residua può inibire la fase di digestione della Proteinasi K; assicurare una disidratazione accurata dei campioni prima dell'inclusione.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni a valle. Per un'ulteriore convalida, si consiglia di attenersi alle linee guida della Conferenza Internazionale sull'Armonizzazione dei Requisiti Tecnici (ICH) riportate in *ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology* (Convalida dei metodi analitici: testo e metodologia).

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Quando si utilizza il QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, può accadere che del RNA, se presente nel campione, venga purificato congiuntamente al DNA.

Caratteristiche delle prestazioni

(Le caratteristiche delle prestazioni rilevanti sono disponibili nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com).

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per i dati di contatto visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

QIAamp MinElute Columns intasate

- | | |
|--|---|
| a) Materiale di partenza eccessivo | Ridurre la quantità di materiale di partenza. È essenziale utilizzare la quantità corretta di materiale di partenza (vedere pagina 17). |
| b) Temperatura di centrifugazione troppo bassa | La temperatura di centrifugazione deve essere di 15–25°C. Alcune centrifughe possono raffreddarsi a una temperatura inferiore a 15°C anche se impostate a 20°C. Ciò può causare la formazione di precipitati che possono intasare le QIAamp MinElute Columns. Se questo si verifica, impostare la temperatura di centrifugazione a 15–25°C. |

Bassa resa del DNA

- | | |
|--|---|
| a) Materiale di partenza eccessivo | Il sovraccarico della QIAamp MinElute Spin Column (colonna spin QIAamp MinElute) riduce significativamente la resa di acidi nucleici. Ridurre la quantità di materiale di partenza (vedere pagina 17). |
| b) Il DNA è ancora legato alla membrana della Rneasy MinElute Spin Column (colonna spin RNeasy MinElute) | Ripetere l'eluizione del DNA, ma incubare per 10 minuti la QIAamp MinElute Spin Column sul banco con il Buffer ATE (tamponi di eluizione) prima della centrifugazione. |
| c) Conservazione errata di tamponi/reagenti | Le QIAamp MinElute Spin Columns devono essere conservate a 2–8°C alla consegna del kit. Controllare la corretta temperatura di conservazione, poiché l'esposizione a temperature più elevate per lunghi periodi di tempo potrebbe causare la perdita di funzionalità. |

Basso valore A_{260}/A_{280}

- | | |
|--|---|
| Acqua utilizzata per diluire l'acido nucleico per misurazioni di A_{260}/A_{280} | Utilizzare Tris Cl 10 mM, pH 7,5, non acqua, per diluire il campione prima di misurarne la purezza. |
|--|---|











DNA non ha una buona resa negli esami e nelle applicazioni downstream








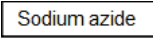


Carryover di etanolo

La centrifugazione delle QIAamp MinElute Columns alla massima velocità è richiesta in 2 fasi della procedura: durante il secondo lavaggio con il Buffer AW2, assicurarsi di centrifugare a $\geq 8.000 \times g$ per 2 minuti a 15–25°C per asciugare la membrana della QIAamp MinElute Spin Column. Dopo la centrifugazione, rimuovere delicatamente la colonna dalla provetta di raccolta, impedendo così alla colonna di entrare in contatto con il flow-through. Quindi, porre la colonna in una nuova provetta di raccolta e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti. La centrifugazione alla massima velocità è richiesta inoltre per far scendere il campione dalle pareti dopo la fase del trattamento con xilene e del lavaggio con etanolo.

Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
 Σ <N>	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)
	Componenti
	Contenuto
	Numero

Simbolo	Definizione del simbolo
	Codice GTIN
Rn	“R” indica la revisione delle Istruzioni per l’uso (manuale) e “n” indica il numero della revisione
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l’uso
	Tenere al riparo dalla luce
	Avvertenza/Cautela
	Proteinasi K
	Azide di sodio
	Al momento della consegna
	Annotare la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone

Simbolo	Definizione del simbolo
EtOH	Etanolo
ADD	Aggiunta
GuHCl	Guanidina cloridrato
MALEIC ACID	Acido maleico
UDI	UDI (identificatore univoco del dispositivo)

Appendice: Manipolazione

Raccomandazioni generali per il trattamento

Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni per evitare la contaminazione dovuta alla superficie della pelle o alla polvere presente sulle apparecchiature di laboratorio. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono comuni fonti di contaminazione. Cambiare spesso i guanti e tenere chiuse le provette. Evitare la contaminazione microbica dei reagenti del kit.

Plastica da laboratorio monouso

Si raccomanda l'uso di provette in polipropilene monouso e sterili durante l'intera procedura.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	N. cat.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (per la purificazione del DNA genomico da tessuti inclusi in paraffina)		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: 50 QIAamp MinElute Columns, proteinasi K, tamponi, provette di lavaggio (2 ml), provette di eluizione (1,5 ml), provette di lisi (2 ml)	60404

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare le Istruzioni per l'uso del rispettivo kit QIAGEN. Le Istruzioni per l'uso dei kit QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richieste ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	<ul style="list-style-type: none">● Aggiornamento alla versione 2 del kit per la conformità all'IVDR● Sezione Descrizione e principio aggiornata● Sezione Materiale necessario ma non in dotazione aggiornata● Sezione Avvertenze e precauzioni aggiornata● Sezione Conservazione e manipolazione dei reagenti aggiornata● Sezione Guida alla risoluzione dei problemi aggiornata● Aggiornamento dell'Appendice
R2, febbraio 2023	<ul style="list-style-type: none">● Aggiornamento della sezione Conservazione e manipolazione dei campioni

Contratto di licenza limitata per il QIAamp DSP DNA Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di fuori delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non garantisce che questo pannello e/o il suo utilizzo non violino i diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello accettano di non prendere o permettere a chiunque altro di prendere misure che potrebbero portare a facilitare qualsiasi atto vietato sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

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

Febbraio 2023 HB-3033-002 1130780IT © 2023 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

