

December 2017

List protokolu QIAsymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP a Tissue_HC_200_V7_DSP

Tento dokument predstavuje *list protokolu QIAsymphony SP* pre Tissue_LC_200_V7_DSP a Tissue_HC_200_V7_DSP, R3, pre súpravu QIAsymphony DSP DNA Mini Kit, verziu 1.

Všeobecné informácie

Súprava QIASymphony DSP DNA Kit je určená na diagnostické použitie in vitro.

Tieto protokoly slúžia na purifikáciu celkovej DNA z tkanív a tkanív fixovaných formaldehydom a zaliatych do parafínu (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) pomocou prístroja QIASymphony SP a súpravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

V závislosti od typu vzorky odporúčame použiť buď protokol pre nízky obsah (low content, LC) alebo vysoký obsah (high content, HC). Tkanivá poskytnú zvýšený výťažok DNA, keď sú spracovávané protokolom pre vysoký obsah, ale ak je potrebná vysoká koncentrácia DNA, možno použiť protokol pre nízky obsah v kombinácii s malým elučným objemom (50 µl). Pre tkanivo FFPE odporúčame používať protokol pre nízky obsah.

Protokol pre nízky obsah

Súprava	Súprava QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236)
Materiál vzorky	Tkanivo FFPE a tkanivo* V jednej preparácii možno kombinovať až 4 tkanivové rezy FFPE, každý s hrúbkou až 10 µm, alebo 8 rezov, s hrúbkou až 5 µm a s povrchom až 250 mm ² .
Názov protokolu	Tissue_LC_200_V7_DSP
Predvolená kontrolná sada analýzy	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elučný objem	50 µl, 100 µl, 200 µl, alebo 400 µl
Požadovaná verzia softvéru	Verzia 4.0 alebo vyššia

* Informácie o tkanivových vzorkách nájdete v protokole pre vysoký obsah.

Protokol pre vysoký obsah

Súprava	Súprava QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236)
Materiál vzorky	Tkanivo Ak nie sú k dispozícii údaje o očakávanom výťažku, odporúčame začať s 25 mg materiálu vzorky. V závislosti od získaného výťažku možno zväčšiť veľkosť vzorky v nasledujúcich preparáciách.
Názov protokolu	Tissue_HC_200_V7_DSP
Predvolená kontrolná sada analýzy	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elučný objem	100 µl, 200 µl, alebo 400 µl
Požadovaná verzia softvéru	Verzia 4.0 alebo vyššia

Požadované materiály, ktoré sa nedodávajú

Pre všetky typy vzoriek

- Pufer ATL, 4 x 50 ml (kat. č. 939016)
- Na minimalizáciu obsahu RNA: RNáza A bez obsahu DNázy (zásobný roztok 100 mg/ml)

Pre tkanivo FFPE (deparafinizácia bez použitia xylénu)

- Deparafinizačný roztok (kat. č. 939018)

Pre tkanivo FFPE (deparafinizácia s použitím xylénu)

- Xylén (99–100 %)
- Etanol (96–100 %)*

Zásuvka „Sample“ (Vzorka)

Typ vzorky	Tkanivo FFPE a tkanivo
Vstupný objem vzorky	220 µl (vyžaduje sa na vzorku, na protokol) [†]
Objem spracovanej vzorky	200 µl
Primárne skúmavky na vzorky	n/a
Sekundárne skúmavky na vzorky	Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Vložky	Závisí od typu použitých skúmaviek na vzorky. Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] Ani pri protokole pre vysoký obsah, ani pri protokole pre nízky obsah systém nerozozná, že je objem vzorky nižší ako 220 µl, pretože prenos vzoriek sa vykonáva bez detekcie hladiny kvapalín. Preto sa ubezpečte, že obsah vstupnej vzorky je 220 µl.

n/a = neaplikovateľné.

Zásuvka „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotrebný materiál)

Pozícia A1 a/alebo A2	Kazeta reagencie
Pozícia B1	n/a
Držiak stojana na špičky 1–17	Jednorazové filtrovacie špičky, 200 µl alebo 1500 µl
Držiak jednotkovej krabice 1-4	Jednotkové krabice obsahujúce kazety s preparátmi vzoriek alebo 8-tyčové kryty

n/a = neaplikovateľné.

* Nepoužívajte denaturovaný alkohol, ktorý obsahuje dodatočné látky, ako je metanol alebo metylketón.

Zásuvka „Waste“ (Odpad)

Držiak jednotkovej krabice 1-4	Prázdne krabice na jednotky
Držiak odpadového vrečka	Odpadové vrečko
Držiak fľaše na tekutý odpad	Prázdna fľaša na tekutý odpad

Zásuvka „Eluate“ (Eluát)

Elučný stojan (odporúčame použiť slot 1, pozíciu chladenia)	Viac informácií nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
---	---

Požadované plastové vybavenie

Plastové vybavenie	Jedna dávka, 24 vzoriek*	Dve dávky, 48 vzoriek*	Tri dávky, 72 vzoriek*	Štyri dávky, 96 vzoriek*
Jednorazové filtrovacie špičky, 200 µl†‡	26	50	74	98
Jednorazové filtrovacie špičky, 1500 µl†‡	72	136	200	264
Kazety s preparátmi vzoriek§	21	42	63	84
8-tyčové kryty¶	3	6	9	12

* Použitie menej ako 24 vzoriek na dávku znižuje počet jednorazových filtračných špičiek potrebných na cyklus.

† V stojane na filtračné špičky sa nachádza 32 filtračných špičiek.

‡ Počet potrebných filtračných špičiek zahŕňa 1 inventárny sken na kazetu s reagensiami.

§ V jednotkovej krabici je 28 kaziet s preparátmi vzoriek.

¶ V jednotkovej krabici je dvanásť 8-tyčových krytov.

Poznámka: Počty daných filtrovacích špičiek sa môžu líšiť od počtov zobrazených na dotykovej obrazovke v závislosti od nastavení. Odporúčame vložiť maximálny možný počet špičiek.

Elučný objem

Elučný objem sa volí na dotykovej obrazovke. V závislosti od typu vzorky a obsahu DNA sa môže výsledný objem eluátu líšiť a byť až do 15 µl nižší než zvolený objem. Z dôvodu, že objem eluátu sa môže líšiť, pri použití automatického systému nastavenia analýzy, ktorý neoveruje objem eluátu pred prenosom, odporúčame skontrolovanie skutočného objemu eluátu. Elúcia v nižších objemoch zvyšuje výslednú koncentráciu DNA, ale mierne znižuje výťažok. Odporúčame používať elučný objem vhodný pre zamýšľanú následnú aplikáciu.

Preparácia materiálu vzorky

Počas práce s chemikáliami noste vždy vhodný laboratórny plášť, jednorazové rukavice a ochranné okuliare. Viac informácií nájdete v príslušných kartách bezpečnostných údajov (Safety Data Sheets, SDS) dostupných u dodávateľa produktu.

Dôležitá informácia pred začatím činnosti

- Magnetické častice QIASymphony ko-purifikujú RNA aj DNA, ak sú vo vzorke prítomné obe. Na minimalizáciu obsahu RNA vo vzorke pridajte do vzorky RNázu A v kroku označenom v príslušnom protokole predbežného spracovania.

Veci, ktoré je potrebné vykonať pred začatím

- Skontrolujte pufer ATL, či neobsahuje biely precipitát. Ak je to potrebné, inkubujte po dobu 30 minút pri 37°C a príležitostne pretrepávajte, aby sa precipitát rozpustil.
- ThermoMixer® alebo trepačku – inkubátor nastavte na teplotu potrebnú pre príslušné predbežné spracovanie.*

Tkanivá

Na purifikáciu DNA možno použiť čerstvé a zmrazené tkanivo. Výťažok a kvalita DNA budú závisieť od typu tkaniva, zdroja a podmienok uchovávanía. Čerstvé tkanivo možno pred spracovaním rozrezať na malé kúsky a skladovať pri teplote –20°C alebo –80°C. Vo všeobecnosti odporúčame používať protokol pre vysoký obsah, ktorý poskytne zvýšené výťažky DNA. Protokol pre nízky obsah, v kombinácii s elučným objemom 50 µl, sa odporúča iba v prípade, že pre následnú analýzu sú potrebné vysoké koncentrácie DNA. Ak nie sú k dispozícii údaje o očakávanom výťažku, odporúčame začať s 25 mg materiálu vzorky, použiť protokol pre vysoký obsah a elučný objem 200 µl. V závislosti od získaného výťažku možno v nasledujúcich preparáciách zväčšiť veľkosť vzorky alebo znížiť elučný objem. Pamätajte, že prílišné naloženie preparátov v kombinácii s malými elučnými objemami môže spôsobiť prenos magnetických častíc do eluátu a môže narušiť čistotu DNA a následnú analýzu.

Protokol predbežného spracovania pre tkanivo

1. Preneste vzorku tkaniva do 2 ml mikrocentrifugačnej skúmavky (nie je súčasťou dodávky).
2. Pridajte 220 µl pufru ATL.

* Overta, či boli zariadenia kontrolované, udržiavané a kalibrované pravidelne podľa odporúčaní výrobcu.

3. Pridajte 20 µl proteinázy K a premiešajte poklepaním na skúmavku.
Poznámka: Použite proteinázu K zo stojanu na enzýmy súpravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
4. Vložte skúmavku do prístroja ThermoMixer alebo do trepačky – inkubátora a inkubujte pri 56°C s trepaním pri 900 ot/min, až kým nedôjde k úplnej lýze tkaniva.
Poznámka: Doba lýzy závisí od toho, aký typ tkaniva sa spracováva. U väčšiny tkanív je lýza hotová do 3 hodín. Ak po 3 hodinách lýza nie je hotová, čo indikuje prítomnosť nerozpustnej hmoty alebo vysoko viskózných lyzátov, dobu lýzy možno predĺžiť, prípadne je možné odstrániť nerozpustnú hmotu centrifugáciou, ako je popísané v kroku 6. Celonočná lýza je možná a neovplyvňuje preparáciu.
5. Na minimalizáciu obsahu RNA vo vzorke pridajte 4 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote (15–25°C) skôr, než prejdete na krok 6.
6. Vzorku homogenizujte tak, že budete niekoľkokrát pipetovať hore a dole.
Poznámka: Ak sa tam stále nachádzajú kusy nerozpustnej hmoty, centrifugujte pri 3000 x g po dobu 1 minúty.
7. Opatrne preneste 220 µl supernatantu do skúmaviek na vzorky, ktoré sú kompatibilné s nosičom vzoriek prístroja QIASymphony SP.
Úplný zoznam kompatibilných skúmaviek nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Odporúčame používať 2 ml skúmavky (napr. Sarstedt® kat. č. 72.693 alebo 72.608).

Tkanivo FFPE

Štandardné postupy fixácie formaldehydom a zalievania do parafínu vždy vedú k značnej fragmentácii nukleových kyselín. Na obmedzenie rozsahu fragmentácie DNA dbajte na nasledujúce opatrenia:

- Čím skôr po chirurgickom odstránení zafixujte vzorky tkaniva v 4–10 % formaldehyde.
- Použite dobu fixácie 14–24 hodín (dlhšie doby fixácie vedú k závažnejšej fragmentácii DNA, čo má za následok zlé vykonanie následných analýz)
- Pred zaliatím vzorky dôkladne dehydrujte (zbytkový formaldehyd môže inhibovať digesciu proteinázy K)

Východiskovým materiálom na purifikáciu DNA by mali byť čerstvo narezané rezy tkaniva FFPE. V jednej preparácii možno spracovať až 4 rezy, každý s hrúbkou až 10 µm, alebo 8 rezov, s hrúbkou až 5 µm a s povrchom až 250 mm². Ak nie je k dispozícii informácia o povahe vášho východiskového materiálu, odporúčame začať s nie viac ako 3 rezmi v jednej preparácii. V

závislosti od výťažku a čistoty DNA môže byť možné použiť až 8 rezov v následných preparáciách.

Poznámka: Protokoly pre tkanivo FFPE sú špeciálne navrhnuté tak, aby ko-purifikovali iba malé množstvá RNA. Povedie to k zníženej hodnote fotometrického merania v porovnaní s hodnotami získanými ručnou súpravou QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue.

Protokol predbežného spracovania pre tkanivo FFPE

Metóda 1: deparafinizácia pomocou deparafinizačného roztoku

1. Pomocou skalpela odstráňte z bloku vzorky prebytočný parafín.
2. Rozrežte až na 4 rezy s hrúbkou 10 µm, alebo až na 8 rezov s hrúbkou 5 µm.
Poznámka: Ak bol povrch vzorky vystavený vzduchu, prvé 2–3 rezy zlikvidujte.
3. Okamžite vložte rezy do 2 ml skúmavky Sarstedt (nie je súčasťou dodávky, kat. č. 72.693 alebo 72.608), ktorá je kompatibilná s nosičom vzoriek prístroja QIAsymphony SP.
4. Pridajte k rezom 200 µl pufra ATL.
5. Pridajte 20 µl proteínázy K.
Poznámka: Použite proteínázu K zo stojanu na enzýmy súpravy QIAsymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Pridajte 160 µl alebo 320 µl deparafinizačného roztoku (pozrite tabuľku nižšie) a premiešajte pomocou vortexu.

Hrúbka rezov	Počet rezov	Objem deparafinizačného roztoku
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Vložte skúmavku do prístroja ThermoMixer alebo do trepačky – inkubátora a inkubujte pri 56°C po dobu 1 hodiny s trepaním pri 1000 ot/min, až kým nedôjde k úplnej lýze tkaniva.
Poznámka: Doba lýzy závisí od toho, aký typ tkaniva sa spracováva. U väčšiny tkanív je lýza hotová do 1 hodiny. Ak po 1 hodine lýza nie je hotová, čo indikuje prítomnosť nerozpustnej hmoty, dobu lýzy možno predĺžiť, prípadne je možné granulovať nerozpustnú hmotu centrifugáciou, ako je popísané v kroku 10. Celonočná lýza je možná a neovplyvňuje preparáciu.

8. Inkubujte pri 90°C po dobu 1 hodiny.
Poznámka: Inkubácia pri 90°C v pufrí ATL čiastočne revertuje formaldehydovú modifikáciu nukleových kyselín. Dlhšie doby inkubácie alebo vyššie teploty inkubácie môžu viesť k fragmentovanejšej DNA. Ak použijete iba jedno ohrievacie teleso, po inkubácii pri 56°C ponechajte vzorku pri izbovej teplote, až kým ohrievacie teleso nedosiahne 90°C.
9. Na minimalizáciu obsahu RNA vo vzorke pridajte do dolnej fázy 2 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote skôr, než prejdete na krok 10. Pred pridaním RNázy A nechajte vzorku vychladnúť na izbovú teplotu.
10. Centrifugujte plnou rýchlosťou 1 minútu pri izbovej teplote.
11. Skúmavky (obsahujúce obe fázy) opatrne preneste do nosiča skúmaviek prístroja QIASymphony SP.

Metóda 2: deparafinizácia pomocou xylénu

1. Pomocou skalpela odstráňte z bloku vzorky prebytočný parafín.
2. Rozrežte až na 4 rezy s hrúbkou 10 µm, alebo až na 8 rezov s hrúbkou 5 µm.
Poznámka: Ak bol povrch vzorky vystavený vzduchu, prvé 2–3 rezy zlikvidujte.
3. Okamžite vložte rezy do mikrocetrifugačnej skúmavky s objemom 1,5 alebo 2 ml (nie je súčasťou dodávky) a pridajte k vzorke 1 ml xylénu. Zatvorte veko a intenzívne miešajte vo vortexe po dobu 10 sekúnd.
4. Centrifugujte plnou rýchlosťou 2 minúty pri izbovej teplote.
5. Supernatant odstráňte pipetovaním. Neodstraňujte žiadne hrudky.
6. Pridajte k hrudke 1 ml etanolu (96–100 %) a premiešajte vo vortexe.
Poznámka: Etanol extrahuje zo vzorky zbytkový xylén.
7. Centrifugujte plnou rýchlosťou 2 minúty pri izbovej teplote.
8. Supernatant odstráňte pipetovaním. Neodstraňujte žiadne hrudky.
Poznámka: Pomocou jemnej pipetovej špičky opatrne odstráňte všetok zbytkový etanol.
9. Otvorte skúmavku a inkubujte pri izbovej teplote (15–25°C) po dobu 10 minút, alebo kým sa všetok zbytkový etanol nevyparí.
Poznámka: Inkubáciu možno vykonať pri teplotách do 37°C.
10. Hrudku znovu rozpustíte v 220 µl pufru ATL.
11. Pridajte 20 µl proteínázy K a premiešajte pomocou vortexu.
Poznámka: Použite proteínázu K zo stojanu na enzýmy súpravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

12. Inkubujte pri 56°C po dobu 1 hodiny (alebo kým nedôjde k úplnej lýze vzorky).
- Poznámka:** Doba lýzy závisí od toho, aký typ tkaniva sa spracováva. U väčšiny tkanív je lýza hotová do 1 hodiny. Ak po 1 hodine lýza nie je hotová, čo je indikované prítomnosťou nerozpustnej hmoty, dobu lýzy možno predĺžiť, prípadne je možné odstrániť nerozpustnú hmotu centrifugáciou, ako je popísané v kroku 16. Celonočná lýza je možná a neovplyvňuje preparáciu.
13. Inkubujte pri 90°C po dobu 1 hodiny.
- Poznámka:** Inkubácia pri 90°C v pufri ATL čiastočne revertuje formaldehydovú modifikáciu nukleových kyselín. Dlhšie doby inkubácie alebo vyššie teploty inkubácie môžu viesť k fragmentovanej DNA. Ak použijete iba jedno ohrievacie teleso, po inkubácii pri 56°C ponechajte vzorku pri izbovej teplote, až kým ohrievacie teleso nedosiahne 90°C.
14. Vzorku krátko centrifugujte na odstránenie kvapôčok z vnútornej strany veka.
15. Na minimalizáciu obsahu RNA vo vzorke pridajte 2 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minúty pri izbovej teplote skôr, než prejdete na krok 16. Pred pridaním RNázy A nechajte vzorku vychladnúť na izbovú teplotu.
16. Opatrne preneste 220 µl lyzátu do skúmaviek na vzorky, ktoré sú kompatibilné s nosičom vzoriek prístroja QIASymphony SP.
- Poznámka:** Ak lyzáty obsahujú nedigerovaný materiál, pred prenosom supernatantu do skúmaviek na vzorky centrifugujte plnou rýchlosťou po dobu 2 minút pri izbovej teplote. Úplný zoznam kompatibilných skúmaviek nájdete na stránke www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Odporúčame používať 2 ml skúmavky (napr. Sarstedt, kat. č. 72.693 alebo 72.608).

História revízií

História revízií dokumentu	
R3 12/2017	Aktualizácia pre QIASymphony softvérová verzia 5.0

Aktuálne licenčné informácie a právne informácie špecifické pre daný produkt nájdete v sprievodcovi alebo používateľskej príručke k súprave QIAGEN®. Sprievodcov a používateľské príručky k súpravám QIAGEN nájdete na lokalite www.qiagen.com alebo o ne môžete požiadať oddelenie technických služieb spoločnosti QIAGEN alebo svojho miestneho distribútora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (skupina QIAGEN); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Registrované názvy, ochranné známky atď. použité v tomto dokumente sa nesmú považovať za známky nechránené podľa zákona, i keď neboli ako také označené príslušným symbolom.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, všetky práva vyhradené.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová lokalita www.qiagen.com