

---

Detsember 2017

# QIAsymphony<sup>®</sup> SP protokollileht

Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP ja Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

See dokument on Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP and Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP QIAsymphony SP seadme protokollileht, R3, komplekti QIAsymphony DSP DNA Mini Kit jaoks, versioon 1.

## Üldteave

Komplekt QIASymphony DSP DNA Kit on ette nähtud kasutamiseks in vitro diagnostikas.

Need protokollid on mõeldud DNA koguhulga määramiseks kudedest ja formaliinis fikseeritud, parafiini sukeldatud (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) kudedest, kasutades QIASymphony SP seadet ja komplekti QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Sõltuvalt proovitüübist soovitame kasutada madala sisaldusega (low content, LC) või kõrge sisaldusega (high content, HC) proovi. Koed annavad suurema DNA saagikuse, kui neid töödeldakse kõrge sisaldusega protokolliga, kuid võib kasutada madala sisaldusega protokolliga koos väikese eluaadi mahuga (50 µl), kui vajalik on kõrge DNA kontsentratsioon. FFPE-koe jaoks soovitame kasutada madala sisaldusega protokolliga.

### Madala sisaldusega protokoll

<b>Komplekt</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (katalooginr 937236)
<b>Proovimaterjal</b>	FFPE-kude ja kude* Ühte preparaati saab kombineerida kuni 4 FFPE-koelõiku, mille iga paksus on kuni 10 µm, või kuni 8 lõiku, kui paksus on kuni 5 µm ja pindala kuni 250 mm <sup>2</sup> .
<b>Protokoll nimetus</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Analüüsi kontrolli vaikekomplekt</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Elueerimismaht</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl või 400 µl
<b>Nõutav tarkvaraversioon</b>	Versioon 4.0 või uuem

\* Koeproovide teavet vt kõrge sisaldusega protokoll.

### Kõrge sisaldusega protokoll

<b>Komplekt</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (katalooginr 937236)
<b>Proovimaterjal</b>	Kude Kui eeldatava saagikuse teave pole saadaval, soovitame alustada 25 mg proovimaterjaliga. Sõltuvalt saadud saagikusest võib proovi suurust järgnevates preparaatides suurendada.
<b>Protokoll nimetus</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Analüüsi kontrolli vaikekomplekt</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Elueerimismaht</b>	100 µl, 200 µl või 400 µl
<b>Nõutav tarkvaraversioon</b>	Versioon 4.0 või uuem

## Vajalikud, kuid tarnekomplekti mittekuuluvad materjalid

### Kõikide proovitüüpide jaoks

- Puhver ATL, 4 x 50 ml (katalooginr 939016)
- RNA sisalduse minimeerimiseks: DNAsasi-vaba RNAas A (lähtelahus 100 mg/ml)

### FFPE-koe jaoks (ksüleenivaba deparafineerimine)

- Deparafineerimislahus (katalooginr 939018)

### FFPE-koe jaoks (deparafineerimine ksüleeniga)

- Ksüleen (99–100%)
- Etanool (96–100%)\*

## „Sample“ (Proovi) sahtel

<b>Proovitüüp</b>	FFPE-kude ja kude
<b>Proovi sisestusmaht</b>	220 µl (vajalik proovi kohta, protokolliga) <sup>†</sup>
<b>Töödeldud proovi maht</b>	200 µl
<b>Primaarsed proovikatsutid</b>	n/a
<b>Sekundaarsed proovikatsutid</b>	Lisateabe saamiseks külastage veebilehte <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
<b>Siseosad</b>	Sõltub kasutatavast proovikatsutist; lisateavet vt <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

<sup>†</sup> Nii kõrge kui ka madala sisaldusega protokollide korral ei tuvasta süsteem väiksemaid proovi mahte kui 220 µl, kuna proovi ülekandmine teostatakse ilma vedelikutaseme tuvastamiseta. Seetõttu veenduge, et proovi sisestusmaht on 220 µl.

n/a = pole kohaldatav

## „Reagents and Consumables“ (Reaktiivide ja tarvikute) sahtel

<b>Positsioon A1 ja/või A2</b>	Reaktiivi kassett
<b>Positsioon B1</b>	n/a
<b>Otsikute statiivi hoidik 1-17</b>	Ühekordsed filterotsikud, 200 µl või 1500 µl
<b>Ühiku karbi hoidik 1-4</b>	Ühiku karbid, mis sisaldavad proovi ettevalmistamise kassette või 8-vardaga kaasi

n/a = pole kohaldatav

\* Ärge kasutage denatureeritud alkoholi, mis sisaldab lisühendeid nagu metanool või metüületüülketoon.

## „Waste“ (Jäätmete) sahtel

Ühiku karbi hoidik 1-4	Tühjad ühiku karbid
Jäätmekoti hoidik	Jäätmekott
Vedeljäätmete pudeli hoidik	Tühi vedeljäätmete pudel

## „Eluate“ (Eluaadi) sahtel

Elueerimisstatiiv (soovitame kasutada pesa 1, jahutusasend)	Lisateabe saamiseks külastage veebilehte <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
---	---

## Vajalik plastvara

Plastikvara	Üks partii, 24 proovi*	Kaks partiid, 48 proovi*	Kolm partiid, 72 proovi*	Neli partiid, 96 proovi*
Ühekordsed filterotsikud, 200 µl <sup>†</sup>	26	50	74	98
Ühekordsed filterotsikud, 1500 µl <sup>††</sup>	72	136	200	264
Proovi ettevalmistamise kassetid <sup>§</sup>	21	42	63	84
8-vardaga kaaned <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Partii kohta vähem kui 24 proovi kasutamine vähendab ühekordsete filtriotsikute vajalikku arvu töötsükli kohta.

<sup>†</sup> Filtriotsikute statiivis on 32 filtriotsikut.

<sup>††</sup> Vajalike filterotsikute arvu hulka on arvatud filterotsikud, mida on vaja üheks inventarisüksuseks reaktiivi kasseti kohta.

<sup>§</sup> Ühiku karbis on 28 proovi ettevalmistamise kasseti.

<sup>¶</sup> Ühiku karbis on kaksteist 8-vardaga kaant.

**Märkus.** Ellpooltoodud filterotsikute arv võib sõltuvalt seadistustest erineda puutekraanil kuvatavast arvust. Soovitame masinasse laadida maksimaalse võimaliku hulga otsikuid.

## Elueerimismaht

Elueerimismaht valitakse puutekraanilt. Sõltuvalt proovitüübist ja DNA sisaldusest võib lõplik eluaadi maht varieeruda ja olla kuni 15 µl väiksem kui valitud maht. Tulenevalt asjaolust, et eluaadi maht võib varieeruda, soovitame kontrollida tegelikku eluaadi mahtu, kui kasutate automatiseeritud Assay Set Systemit, mis ei kontrolli eluaadi mahtu enne ülekandmist. Elueerimine väiksemates kogustes tõstab lõpliku DNA kontsentratsiooni, kuid vähendab vähesel määral saagist. Soovitame kasutada elueerimismahtu, mis sobiks soovitud allasuunas rakenduse jaoks.

## Proovimaterjali ettevalmistamine

Kemikaalidega töötamisel kandke alati sobivat laborikiltit, ühekordselt kasutatavaid kindaid ja kaitseprille. Lisateabe saamiseks tutvuge toote tarnija poolt pakutava vastava ohutuskaardiga (safety data sheets, SDSs).

Enne alustamist pidage silmas järgmist

- QIAAsymphony magnetilised osakesed puhastavad RNA-d ja DNA-d, kui neid mõlemaid leidub proovis. Proovi RNA sisalduse minimeerimiseks lisage vastava eeltötlusprotokolli asjakohases etapis proovile RNAas A-d.

Mida on vaja teha enne alustamist

- Kontrollige puhvrit ATL valge sademe osas. Vajadusel inkubeerige 30 minutit temperatuuril 37 °C aeg-ajalt loksutades, et sade lahustada.
- Viige ThermoMixer® või raputi-inkubaator vastavaks eeltötluseks vajalikule temperatuurile.\*

Koed

DNA puhastamiseks saab kasutada värsked ja külmutatud kude. DNA saagikus ja kvaliteet sõltuvad proovitüübist, allikast ja säilitustingimustest. Värsket kude saab enne töötlemist väikestest tükkidest lõigata ja temperatuuril –20 °C või –80 °C säilitada. Üldiselt soovitame kasutada kõrge sisaldusega protokoll, mis tagab suurenenud DNA saagikuse. Madala sisaldusega protokoll koos elueerimismahuga 50 µl on soovitatav kasutada ainult siis, kui allasuunas analüüsimiseks on vaja kõrgeid DNA kontsentratsioone. Kui eeldatava saagikuse teave pole saadaval, soovitame alustada 25 mg proovimaterjaliga, kasutades kõrge sisaldusega protokoll ja elueerimismahtu 200 µl. Sõltuvalt saadud saagikusest võib proovi suurust järgnevates preparaatides suurendada või elueerimismahtu vähendada. Võtke teadmiseks, et preparaatide ülelaadimiseks koos väikeste elueerimismahtudega võib põhjustada magnetiliste osakeste ülekandumist eluaati ja võib ohtu seada DNA puhtuse ja allasuunas analüüsi.

### Koe eeltötluse protokoll

1. Viige koeproov 2 ml mikrotsentrifuugi katsutisse (ei sisaldu komplektis).
2. Lisage 220 µl puhvrit ATL.
3. Lisage 20 µl proteinaasi K ja segage katsutile koputades.

\* Veenduge, et seadmed on kontrollitud, hooldatud ja regulaarselt kalibreeritud vastavalt tootja juhiste.

**Märkus.** Kasutage QIASymphony DSP DNA Mini Kiti ensüümide statiivi proteinaas K-d.

4. Asetage katsuti ThermoMixerisse või raputi-inkubaatorisse ja inkubeerige temperatuuril 56 °C, raputades kiirusel 900 p/min, kuni kude on täielikult lüüsunud.

**Märkus.** Lüüsimise aeg erineb sõltuvalt töödeldavast koetüübist. Enamiku kudede korral on lüüsimine lõpule viidud 3 tunni jooksul. Kui lüüs pole 3 tunni pärast lõpetatud, millele viitab lahustumatu materjali või suure viskoossusega lüsaadi olemasolu, võib lüüsimise aega pikendada või tsentrifuugides lahustumatu materjali eemaldada, nagu on kirjeldatud sammus 6. Üleöö lüüsimine on võimalik ega mõjuta preparaati.

5. Proovi RNA sisalduse minimeerimiseks lisage 4 µl RNAas A-d (100 mg/ml) ja inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril (15–25 °C), enne kui jätkate sammuga 6.
6. Homogeniseerige proov seda korduvalt üles-alla pipeteerides.

**Märkus.** Kui endiselt leidub lahustumatut materjali, tsentrifuugige 1 minut 3000 x g juures.

7. Kandke ettevaatlikult üle 220 µl supernatanti proovikatsutitesse, mis ühilduvad QIASymphony SP seadme proovikanduriga.

Ühilduvate proovikatsutite täielikku loetelu vt [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks).

Soovitame kasutada 2 ml katsuteid (nt Sarstedt® katalooginr 72.693 või 72.608).

## FFPE-kude

Standardsed formaliini fikseerimise ja parafiini sukeldamise protseduurid põhjustavad alati nukleiinhapete olulist fragmenteerumist. DNA fragmentatsiooni ulatuse piiramiseks veenduge, et

- fikseerite koeproovid pärast kirurgilist eemaldamist nii kiiresti kui võimalik 4–10% formaliinis;
- rakendate fikseerimisajaga 14–24 tundi (pikemad fikseerimisaja põhjustavad ulatuslikumat DNA fragmentatsiooni põhjustades ebakvaliteetset allasuunas analüüsimist);
- dehüdreerite proovid hoolikalt enne sukeldamist (formaliini jäägid võivad proteinaas K-ga lõhustamist pärssida);

DNA puhastamise lähtematerjaliks peavad olema FFPE-koest värskelt lõigatud lõigud. Ühes preparaadis saab töödelda kuni 4 lõiku, mille iga paksus on kuni 10 µm, või kuni 8 lõiku, kui paksus on kuni 5 µm ja pindala kuni 250 mm<sup>2</sup>. Kui teave teie lähtematerjali loomuse kohta pole saadaval, soovitame alustada mitte rohkem kui 3 lõiguga ühes preparaadis. Sõltuvalt DNA saagikusest ja puhtusest võib olla võimalik järgmises preparaadis kasutada kuni 8 lõiku.

**Märkus.** FFPE-koete protokollid on loodud spetsiaalselt ainult väikeste RNA hulkade samaaegseks puhastamiseks. See põhjustab väiksemat fotomeetrilist mõõteväärtust võrreldes käsitsi QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue komplektiga saadud väärtustega.

## FFPE-koe eeltötluse protokoll

Meetod 1: deparafineerimine, kasutades lahust Deparaffinization Solution

1. Eemaldage prooviplokilt skalpelliga liigne parafiin.
2. Lõigake kuni 4 koelõiku paksusega 10 µm või kuni 8 koelõiku paksusega 5 µm.  
**Märkus.** Kui proovi pind on õhuga kokku puutunud, visake esimesed 2–3 koelõiku ära.
3. Asetage koelõigud kohe 2 ml Sarstedti katsutisse (ei kuulu komplekti, kataloogi nr 72.693 või 72.608), mis ühildub QIASymphony SP seadme proovikanduriga.
4. Lisage koelõikudele 200 µl puhvrit ATL.
5. Lisage 20 µl proteinaas K-d.  
**Märkus.** Kasutage QIASymphony DSP DNA Mini Kiti ensüümide statiivi proteinaas K-d.
6. Lisage 160 µl või 320 µl lahust Deparaffinization Solution (vt tabel all) ja segage vibratsiooniseadmega.

Koelõigu paksus	Koelõikude arv	Deparafineerimislahuse maht
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Asetage katsuti ThermoMixerisse või raputi-inkubaatorisse ja inkubeerige 1 tund temperatuuril 56 °C, raputades kiirusel 1000 p/min, kuni kude on täielikult lüüsunud.  
**Märkus.** Lüüsimise aeg erineb sõltuvalt töödeldavast koetüübist. Enamiku kudede korral on lüüsimine lõpule viidud 1 tunni jooksul. Kui lüüs pole 1 tunni pärast lõpetatud, millele viitab lahustumatu materjali olemasolu, võib lüüsimise aega pikendada või tsentrifuugides lahustumatu materjali pelletiteks muuta, nagu on kirjeldatud sammus 10. Üleöö lüüsimine on võimalik ega mõjuta preparaati.
8. Inkubeerige 1 tund temperatuuril 90 °C.  
**Märkus.** Inkubeerimine temperatuuril 90 °C puhvris ATL pöörab osaliselt ümber formaldehüüdiga nukleiinhapete modifikatsiooni. Pikemad inkubeerimisajad või kõrgemad inkubeerimistemperatuuri võivad põhjustada rohkem fragmenteerunud DNAd. Ainult ühte soojendusplokki kasutades jätke proov pärast temperatuuril 56 °C inkubeerimist toatemperatuurile, kuni soojendusploki soojeneb temperatuurini 90 °C.
9. Proovi RNA sisalduse minimeerimiseks lisage madalasse faasi 2 µl RNAas A-d (100 mg/ml) ja inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril, enne kui jätkate sammuga 10. Enne RNAas A lisamist laske proovil toatemperatuuril jahtuda.

10. Tsentrifuugige 1 minut täiskiirusel toetemperatuuril.
11. Viige transpordikatsutid (sisaldavad mõlemat faasi) seadme QIA Symphony SP proovikandurile.

## Meetod 2: ksüleeniga deparafineerimine

1. Eemaldage prooviplokilt skalpelliga liigne parafiin.
2. Lõigake kuni 4 koelõiku paksusega 10 µm või kuni 8 koelõiku paksusega 5 µm.  
**Märkus.** Kui proovi pind on õhuga kokku puutunud, visake esimesed 2–3 koelõiku ära.
3. Viige koelõigud viivitamatult 1,5 või 2 ml mikrotsentrifuugi katsutisse (ei sisaldu komplektis) ja lisage proovile 1 ml ksüleeni. Sulgege kaas ja segage vibratsioonisegistiga tugevalt 10 sekundit.
4. Tsentrifuugige 2 minutit täiskiirusel toetemperatuuril.
5. Eemaldage pipeteerides supernatant. Ärge eemaldage pelletit.
6. Lisage pelletile 1 ml etanooli (96–100%) ja segage vibratsioonisegistiga.  
**Märkus.** Etanool ekstraheerib proovist ksüleeni jäägid.
7. Tsentrifuugige 2 minutit täiskiirusel toetemperatuuril.
8. Eemaldage pipeteerides supernatant. Ärge eemaldage pelletit.  
**Märkus.** Eemaldage etanooli jäägid ettevaatlikult peenikese pipetiotsikuga.
9. Avage katsuti ja inkubeerige 10 minutit temperatuuril (15–25 °C) või kuni etanooli jäägid on aurustunud.  
**Märkus.** Inkubeerida võib temperatuuril kuni 37 °C.
10. Suspendeerige pellet uuesti 220 µl puhvrise ATL.
11. Lisage 20 µl proteinaasi K ja segage vibratsioonisegistiga.  
**Märkus.** Kasutage QIA Symphony DSP DNA Mini Kiti ensüümide statiivi proteinaas K-d.
12. Inkubeerige 1 tund temperatuuril 56 °C (või kuni proov on täielikult lüüsunud).  
**Märkus.** Lüüsimise aeg erineb sõltuvalt töödeldavast koetüübist. Enamiku kudede korral on lüüsimine lõpule viidud 1 tunni jooksul. Kui lüüs pole 1 tunni pärast lõpetatud, millele viitab lahustumatu materjali olemasolu, võib lüüsimise aega pikendada või tsentrifuugides lahustumatu materjali eemaldada, nagu on kirjeldatud sammus 16. Üleöö lüüsimine on võimalik ega mõjuta preparaati.
13. Inkubeerige 1 tund temperatuuril 90 °C.  
**Märkus.** Inkubeerimine temperatuuril 90 °C puhvrise ATL pöörab osaliselt ümber formaldehüüdiga nukleiinhapete modifikatsiooni. Pikemad inkubeerimisajad või kõrgemad inkubeerimistemperatuuri võivad põhjustada rohkem fragmenteerunud DNAd. Ainult ühte



soojendusplokki kasutades jätke proov pärast temperatuuril 56 °C inkubeerimist toatemperatuurile, kuni soojendusploki soojeneb temperatuurini 90 °C.

14. Tsentrifuugige proovi lühidalt, et eemaldada tilgad kaane sisepinnalt.
15. Proovi RNA sisalduse minimeerimiseks lisage 2 µl RNAas A-d (100 mg/ml) ja inkubeerige 2 minutit toatemperatuuril, enne kui jätkate sammuga 16. Enne RNAas A lisamist laske proovil toatemperatuurile jahtuda.
16. Kandke ettevaatlikult üle 220 µl lüsaati proovikatsutitesse, mis ühilduvad QIASymphony SP seadme proovikanduriga.

**Märkus.** Kui lüsaadid sisaldavad lõhustamata materjali, tsentrifuugige toatemperatuuril 2 minutit täiskiirusel, enne supernatandi ülekanmist proovikatsutitesse. Ühilduvate proovikatsutite täielikku loetelu vt [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Soovitame kasutada 2 ml katsuteid (nt Sarstedt, katalooginr 72.693 või 72.608).

## Muudatuste ajalugu

Dokumendi muudatuste ajalugu	
R3 12/2017	QIASymphony tarkvaraversiooni 5.0 värskendus

Ajakohase litsentsiteabe ja tootespetsiifilised õigustest loobumised leiate asjakohasest QIAGEN® komplekti käsiraamatust või kasutusjuhendist. QIAGEN komplektide käsiraamatud ja kasutusjuhendid on saadaval veebilehel [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) või tellimisel QIAGEN tehniliselt toelt või kohalikul müügiesindajalt.

Kaubamärgid: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Käesolevas dokumendis kasutatud registreeritud nimetused, kaubamärgid jne loetakse seadusega kaitstuks ka juhul, kui need pole eraldi kaubamärkidena tähistatud.  
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN. Kõik õigused kaitstud.

---

Tellimine [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Tehniline tugi [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Veebisait [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)