

# Instrucțiuni de utilizare (manual) pentru RNeasy<sup>®</sup> DSP FFPE Kit



50

Versiunea 2

**IVD**

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro  
A se utiliza cu RNeasy DSP FFPE Kit

**CE**

**REF**

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1 **MAT**

1127532RO

# Cuprins

Domeniul de utilizare .....	4
Utilizatori potențiali .....	4
Descrierea și principiul .....	5
Rezumat și explicații .....	5
Principiile procedurii .....	6
Materiale furnizate .....	8
Conținutul kitului .....	8
Componentele kitului .....	9
Materiale necesare, dar nefurnizate .....	10
Avertizări și precauții .....	11
Informații de siguranță .....	11
Informații pentru situații de urgență .....	12
Precauții .....	12
Depozitarea și manipularea reactivilor .....	14
Stabilitatea în utilizare .....	14
Componentele kitului .....	14
Procedură .....	15
Informații importante înainte de a începe .....	15
Prepararea soluțiilor tampon .....	16
Operațiuni care trebuie executate înainte de începere .....	17
Protocol: Purificarea ARN-ului total din secțiuni de țesut FFPE .....	18

Controlul calității .....	23
Limitări .....	23
Caracteristici de performanță .....	24
Eliminare .....	25
Ghid de depanare .....	26
Simboluri .....	29
Date de contact .....	31
Anexă: Observații generale privind manipularea ARN .....	32
Informații pentru comandă .....	35
Istoricul revizuirilor documentului .....	36

## Domeniul de utilizare

RNeasy DSP FFPE Kit este un sistem destinat purificării manuale a ARN-ului total din țesuturi fixate în formol și înglobate în parafină (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Acesta se bazează pe un protocol optimizat bazat pe coloana de centrifugare cu silice și include îndepărtarea enzimatică a ADN-ului rezidual.

RNeasy DSP FFPE Kit este destinat utilizării pentru diagnostic in vitro

## Utilizatori potențiali

Produsul este destinat utilizării de către utilizatori profesioniști, cum ar fi tehnicieni și medici care sunt instruiți în tehnicile de biologie moleculară.

# Descrierea și principiul

## Rezumat și explicații

RNeasy DSP FFPE Kit este special conceput pentru purificarea ARN-ului total din secțiuni de țesut fixate în formol și înglobate în parafină (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE). Prin izolarea moleculelor de ARN mai lungi de 70 de nucleotide, kitul asigură recuperarea fragmentelor de ARN utilizabile pentru aplicații precum RT-PCR.

Datorită condițiilor de fixare și înglobare, acizii nucleici din probele FFPE sunt de obicei fragmentați și modificați chimic de formaldehidă. Prin urmare, acizii nucleici izolați din probele FFPE au adesea o masă moleculară mai mică decât cei obținuți din probe proaspete sau congelate. Gradul de fragmentare depinde de tipul și vechimea probei și de condițiile de fixare, înglobare și depozitare a probei. Pentru standardizarea proceselor premergătoare examinării pentru țesutul FFPE, vă recomandăm să procedați conform ISO 20166-1:2018 „Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 1: Isolated RNA” (Examinări pentru diagnosticare in vitro moleculară – Specificații pentru procesele premergătoare examinării pentru țesutul fixat în formol și înglobat în parafină (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) – Partea 1: ARN-ul izolat).

Deși modificarea în formaldehidă nu poate fi detectată în testele standard de control al calității, cum ar fi electroforeza în gel sau analiza de tip lab-on-a-chip, interferează puternic cu analizele enzimatice.

Deși RNeasy DSP FFPE Kit este optimizat pentru a inversa cât mai mult posibil modificarea în formaldehidă fără degradare ulterioară a ARN-ului, acizii nucleici purificați din probele FFPE nu ar trebui să fie utilizați în aplicații din aval care necesită ARN de lungime completă. Unele aplicații pot necesita modificări pentru a permite utilizarea ARN-ului fragmentat (de exemplu, proiectarea de ampliconi mici pentru RT-PCR). Pentru sinteza ADN-ului complementar ar trebui utilizate soluții de amorsare aleatorii sau specifice genei în locul soluțiilor de amorsare oligo-dT.

Colorarea secțiunilor FFPE poate afecta, de asemenea, calitatea și performanța ARN-ului în aplicațiile din aval. Acest lucru este valabil mai ales pentru multe protocoale de colorare imunohistochimică

## Principiile procedurii

Procedura RNeasy DSP FFPE utilizează tehnologia RNeasy consacrată pentru purificarea ARN-ului. Condițiile de liză special optimizate permit purificarea eficientă a ARN-ului total din secțiuni de țesut FFPE. Etapa de digestie cu DNază I elimină eficient contaminarea ADN-ului, inclusiv moleculele foarte fragmentate.

În primul rând, se îndepărtează toată parafina secțiunilor de țesut FFPE prin tratarea cu Deparaffinization Solution. Apoi, probele sunt incubate într-o soluție tampon pentru liză optimizată, care conține proteinază K pentru a elibera ARN-ul din secțiuni. O scurtă incubare la o temperatură mai mare inversează parțial reticularea formalinei a acizilor nucleici eliberați, îmbunătățind rezultatul și calitatea ARN-ului, precum și performanța ARN-ului în testele enzimice din aval. Acesta este urmat de un tratament cu DNază I care este optimizat pentru a elimina ADN-ul genomic, inclusiv fragmente de ADN foarte mici care sunt adesea prezente în probele FFPE după fixarea prelungită în formol și/sau timpuri lungi de depozitare. Apoi, lizatul este amestecat cu Buffer RBC. Se adaugă etanol pentru a oferi condiții de legare adecvate pentru ARN, iar proba este apoi aplicată unei coloane de centrifugare RNeasy MinElute, unde ARN-ul total se leagă de membrană și agenții de contaminare sunt spălați eficient. ARN-ul este apoi eluat în minimum 14 µl de apă fără RN-aze.

## Procedura RNeasy DSP FFPE

Secțiuni de țesut FFPE

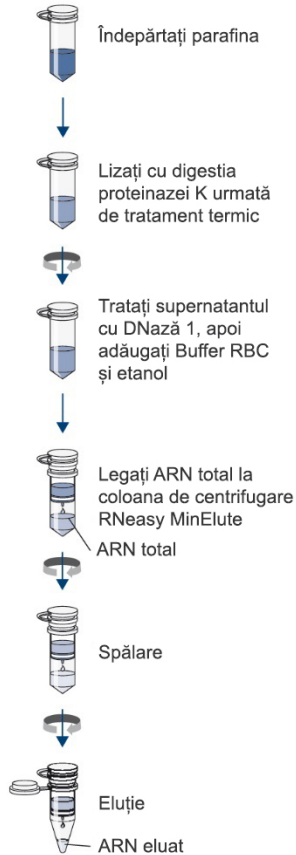


Figura 1. Procedura de purificare a ARN-ului din țesutul FFPE utilizând RNeasy DSP FFPE Kit.

# Materiale furnizate

## Conținutul kitului

<b>RNeasy DSP FFPE Kit</b>	<b>(50)</b>
<b>Nr. de catalog</b>	<b>73604</b>
<b>Număr de preparate</b>	<b>50</b>

	<b>Identitate</b>	<b>Simboluri</b>	<b>Cantitate</b>
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (roz) (fiecare în câte un 2 ml Collection Tube)	<b>COL</b>	50
ET	Elution Tubes (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
LT	Lysis Tubes (2 ml)	<b>LYS TUBE</b>	150
WT	Wash Tubes (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	250
DPS	Deparaffinization Solution	<b>DEPAR SOL</b>	20 ml
RBC	Buffer RBC*	<b>BIND BUF</b>	45 ml
PKD	Buffer PKD	<b>PROTK DIL</b>	15 ml
PK	Proteinase K	<b>PROTK</b>	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (liofilizată)	<b>DNase</b>	1
RNFW	RNase-free Water	<b>ELU DIL</b>	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer	<b>DNase BUF</b>	2 ml
RPE	Buffer RPE† (concentrat)	<b>WASH BUF CONC</b>	11 ml
HB, v2	Manual pentru RNeasy DSP FFPE Kit		1

\* Conține sare de guanidină. Nu este compatibil cu dezinfectanții care conțin soluții de albire. Consultați pagina 11 pentru informații privind siguranța.

† Înainte de prima utilizare, adăugați 4 volume de etanol (96–100 %, nedenaturat) așa cum este indicat pe flacon și descris la pagina 16 pentru a obține o soluție de lucru.



## Componentele kitului

Principalele componente ale kitului sunt explicate mai jos.

**Tabelul 1. Reactivi furnizați care conțin ingrediente active**

Reactiv		Componente	Volum
Simbol	Nume		
DPS	Deparaffinization Solution	Hexadecane	≥ 90 % până la ≤ 100 % procent de masă
RBC	Buffer RBC	Clorhidrat de guanidină	≥ 30 % până la 70 % procent de masă
PKD	Buffer PKD	Niciunul	–
PK	Proteinase K	Proteinase K	≥ 1 % până la < 3 % procent de masă
DN	RNase-Free DNase I (liofilizată)	DNase	≥ 90 % până la ≤ 100 % procent de masă
RNFW	RNase-free Water	Niciunul	–
DBB	DNase Booster Buffer	Niciunul	–
RPE	Buffer RPE (concentrat)	Niciunul	–

Pentru a reduce la minimum riscul oricărui impact negativ asupra rezultatelor de diagnostic generate după izolarea ARN-ului, trebuie utilizate substanțe de control adecvate pentru aplicațiile din aval.

## Materiale necesare, dar nefurnizate

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

Asigurați-vă că instrumentele au fost verificate și calibrate în conformitate cu recomandările producătorului.

- Pipete și vârfuri de pipete sterile, fără RN-aze
- Microcentrifugă (cu rotor pentru eprubete de 2 ml)
- Agitator vortex
- Etanol 96–100 % (nu utilizați alcool denaturat, care conține alte substanțe, precum metanol sau metiletilcetonă)
- Mănuși de unică folosință
- Bloc de încălzire cu funcție de agitare, cu capacitate de incubație la 56 °C și 80 °C

## Avertizări și precauții

Vă rugăm să rețineți că este posibil să aveți obligația de a consulta reglementările locale privind raportarea incidentelor grave survenite în legătură cu dispozitivul către producător și autoritatea de reglementare în care își are sediul/domiciliul utilizatorul și/sau pacientul.

Toate atenuările preconizate au fost implementate atunci când a fost posibil în această etapă a dezvoltării produsului și au fost revizuite sistematic. Pe baza managementului riscului, riscul rezidual general este considerat acceptabil, iar utilizarea dispozitivului este considerată sigură. Nu există riscuri reziduale pentru RNeasy DSP FFPE Kit.

A se utiliza pentru diagnosticarea in vitro.

Consultați cu atenție toate instrucțiunile înainte de utilizarea kitului.

## Informații de siguranță

Atunci când lucrați cu substanțe chimice, utilizați întotdeauna un halat de laborator, mănuși de unică folosință și ochelari de protecție adecvați. Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online în format PDF la adresa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa SDS pentru fiecare kit QIAGEN și pentru componentele kiturilor.

AVERTISMENT Riscul de vătămare corporală



NU adăugați soluții de albire sau soluții acide direct în deșeurile rezultate din prepararea probelor.

Soluțiile tampon din RNeasy DSP FFPE Kit conțin azidă de sodiu. Dacă soluțiile tampon aferente kitului se varsă, curățați cu un detergent adecvat pentru laborator și cu apă. Dacă lichidul vărsat conține agenți potențial infecțioși, curățați mai întâi zona afectată cu detergent pentru laborator și cu apă, iar apoi cu hipoclorit de sodiu 1% (v/v).

## Informații pentru situații de urgență

CHEMTREC

SUA și Canada 1-800-424-9300

În afara SUA și a Canadei +1 703-527-3887

## Precauții

Următoarele fraze de pericol și de precauție se aplică pentru componentele RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNFW, DBB

**Conține:** Azidă de sodiu. Avertisment! Poate fi nociv în caz de înghițire. Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic, dacă nu vă simțiți bine.

### Deparaffinization Solution



Conține: hexadecan. Pericol! Poate fi mortal în caz de înghițire și de pătrundere în căile respiratorii. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Poate provoca iritarea căilor respiratorii. Poate provoca efecte dăunătoare de lungă durată asupra vieții acvatice. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. **ÎN CAZ DE expunere sau de posibilă expunere:** Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau un medic. NU provocați vomă. A se depozita sub cheie. Eliminați conținutul/recipientul la o unitate autorizată de eliminare a deșeurilor.

### Proteinaze K



Conține: Proteinază K. Pericol! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceața/vaporii/spray-ul. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. Purtați echipament de protecție respiratorie. ÎN CAZ DE expunere sau de posibilă expunere: Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic. Scoateți persoana la aer curat și mențineți o poziție confortabilă pentru respirat. Eliminați conținutul/recipientul la o unitate autorizată de eliminare a deșeurilor.

### DNază I



Conține: DNază. Pericol! Poate provoca o reacție alergică a pielii. Poate provoca simptome de alergie sau astm sau dificultăți de respirație în caz de inhalare. Evitați să inspirați praful/fumul/gazul/ceața/vaporii/spray-ul. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție. Purtați echipament de protecție respiratorie. În caz de expunere sau de posibilă expunere: Sunați la un CENTRU DE INFORMARE TOXICOLOGICĂ sau la un medic. Scoateți persoana la aer curat și mențineți o poziție confortabilă pentru respirat.

### Buffer RBC



Conține: clorhidrat de guanidină. Avertisment! Nociv în caz de înghițire sau inhalare. Provoacă iritarea pielii. Provoacă o iritare gravă a ochilor. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

### DNase Booster Buffer



Avertisment! Provoacă iritarea ușoară a pielii. Purtați mănuși de protecție/îmbrăcăminte de protecție/ochelari de protecție/mască de protecție.

# Depozitarea și manipularea reactivilor

Coloanele de centrifugare RNase-Free DNase I și RNeasy MinElute trebuie depozitate la 2-8 °C imediat după sosire. Soluțiile tampon pot fi depozitate la temperatura camerei (15-25 °C). În aceste condiții, kitul poate fi depozitat conform datei de expirare de pe eticheta cutiei, fără ca performanța să fie diminuată.

Nu utilizați RNeasy DSP FFPE Kit după expirare.

## Stabilitatea în utilizare

Kitul poate fi utilizat timp de 10 luni de la prima utilizare sau până la data de expirare.

## Componentele kitului

Datele de expirare pentru fiecare reactiv sunt indicate pe etichetele componentelor individuale. În condiții de depozitare corecte, produsul își va păstra performanța pentru perioada de stabilitate, atât timp cât se folosesc aceleași loturi de componente.

Pentru depozitarea pe termen lung a DNazei I după reconstituire, îndepărtați soluția standard din flacon, împărțiți-o în părți alicote de unică folosință și depozitați-o între -15 și -30 °C timp de până la 10 luni. Părțile alicote decongelate pot fi depozitate la 2-8 °C timp de până la 8 săptămâni. Nu recongelați părțile alicote după decongelare.

Evitați expunerea reactivilor la lumina ultravioletă (de exemplu, utilizată pentru decontaminare), deoarece aceasta poate provoca degradarea accelerată.

# Procedură

## Informații importante înainte de a începe

### Materialul inițial

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

- Utilizați mostre de țesut cu grosimea mai mică de 5 mm pentru a permite penetrarea completă a formolului
- Fixați probele de țesut în 4–10 % formol tamponat neutru cât se poate de repede după rezecția chirurgicală
- Folosiți un timp maxim de fixare de 24 de ore (timpii de fixare mai mari au ca rezultat o fixare excesivă și fragmentare mai mare a acidului nucleic, rezultând o performanță slabă în testele din aval)
- Deshidratați bine probele înainte de înglobare
- Utilizați parafină cu punct de topire scăzut pentru înglobare

Materialul inițial pentru purificarea ARN trebuie să fie secțiuni tăiate de țesut FFPE, fiecare cu o grosime de până la 20  $\mu\text{m}$ . Secțiunile mai groase pot duce la rezultate mai slabe ale acidului nucleic, chiar și după incubarea prelungită cu proteinază K. Într-un singur preparat pot fi combinate până la 4 secțiuni, fiecare cu o grosime de maximum 10  $\mu\text{m}$ . Pot fi combinate mai mult de 4 secțiuni dacă suma totală a grosimii secțiunilor este de 40  $\mu\text{m}$  sau mai mică (de exemplu, opt secțiuni cu grosimea de 5  $\mu\text{m}$ ).

Pentru țesuturile cu conținut deosebit de mare de ADN, vă recomandăm să folosiți mai puține secțiuni per preparat pentru a evita contaminarea cu ADN a ARN-ului purificat.

Dacă nu există informații despre natura materialului inițial, vă recomandăm să începeți cu maximum 2 secțiuni per preparat. În funcție de rezultatul și de puritatea ARN-ului, poate fi posibilă utilizarea a maximum 4 secțiuni în preparatele ulterioare. Cu toate acestea, supraîncărcarea coloanei de centrifugare RNeasy MinElute ar putea reduce semnificativ rezultatul și calitatea ARN-ului.

## Prepararea soluțiilor tampon

### Prepararea soluției standard de DNază I

Preparați soluția standard de DNază I prin dizolvarea DNazei I liofilizate în 550 µl de apă fără RN-aze. Pentru a evita pierderea DNazei I, nu deschideți flaconul. Injectați apă fără RN-aze în flacon folosind un ac și o seringă fără RN-aze. Amestecați ușor prin răsturnarea flaconului. Nu agitați în agitatorul vortex.

În unele cazuri, flaconul de DNază I poate părea gol. Acest lucru este cauzat de lipirea enzimei liofilizate de sept. Pentru a evita pierderea DNazei I, nu deschideți flaconul. În schimb, dizolvați DNaza I folosind un ac și o seringă așa cum este descris mai jos.

**Notă:** DNaza I este deosebit de sensibilă la denaturarea fizică. Omogenizarea trebuie efectuată numai prin răsturnarea ușoară a flaconului.

**Notă:** Aveți grijă ca întregul volum de apă fără RN-aze să fie injectat în flacon.

Poate rămâne material insolubil după dizolvarea DNazei I. În urma procesului de producție, materialul insolubil poate fi prezent în DNaza I liofilizată. Acest lucru nu afectează performanța DNazei I.



Pentru depozitarea pe termen lung a DNazei I, îndepărtați soluția standard din flacon, împărțiți-o în părți alicote de unică folosință și depozitați-o între -15 și -30 °C timp de până la 10 luni. Părțile alicote decongelate pot fi depozitate la 2–8 °C timp de până la 8 săptămâni. Nu recongelați părțile alicote după decongelare.

## Prepararea Buffer RPE

Adăugați 4 volume (44 ml) de etanol (96–100 %) în flaconul care conține 11 ml de Buffer RPE concentrat. Bifați caseta de selectare de pe eticheta flaconului pentru a indica faptul că a fost adăugat etanol.

**Notă:** Înainte de a începe procedura, omogenizați Buffer RPE reconstituit prin agitare.

## Operațiuni care trebuie executate înainte de începere

- Dacă utilizați RNeasy DSP FFPE Kit pentru prima dată, citiți „Informații importante înainte de a începe” (pagina 15)
- Dacă lucrați cu ARN pentru prima dată, citiți „Anexă: Observații generale privind manipularea ARN” (pagina 31).
- Buffer RBC conține o sare de guanidină și, prin urmare, nu este compatibil cu reactivii de dezinfectare, care conțin soluții de albire. Consultați pagina 11 pentru informații privind siguranța.
- Dacă nu se indică altfel, efectuați toate etapele procedurii la temperatura camerei (15-25 °C). În timpul procedurii, lucrați cu rapiditate; nu faceți pauze.
- Parcurgeți toate etapele de centrifugare folosind o microcentrifugă plasată la 15–25 °C. Dacă utilizați o microcentrifugă refrigerată, setați temperatura la 20–25 °C, altfel poate apărea o răcire semnificativă sub 15 °C.
- În procedura de mai jos, ▲ indică volumele de utilizat dacă se procesează 1–2 secțiuni per probă, în timp ce ● indică volumele de utilizat dacă se procesează 3–4 secțiuni per probă.

- Dacă utilizați Buffer RPE și RNase-Free DNase I pentru prima dată, reconstituiți-le așa cum este descris în „Prepararea soluțiilor tampon” (pagina 16).
- Echilibrați toate soluțiile tampon la temperatura camerei (15–25 °C). Omogenați Buffer RPE reconstituit prin agitare.
- Setați un agitator termic la 56 °C pentru utilizare la pasul 5 și pasul 9. Pentru a reduce timpul de așteptare, setați un al doilea agitator termic la 80 °C pentru utilizare la pasul 9.
- **Notă:** Nu faceți pauze în timpul procedurii de purificare, deoarece timpii de incubare crescuți pot duce la pierderea sau degradarea ARN-ului. Timpul mediu de procesare a maximum 12 probe în paralel este de aproximativ 130 de minute.

## Protocol: Purificarea ARN-ului total din secțiuni de țesut FFPE

1. Utilizând un bisturiu, tăiați parafina în exces de pe blocul de probă.
2. Tăiați secțiuni cu grosimea de 5–20 μm.  
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 și închideți capacul.
4. Adăugați ▲ 160 sau ■ 320 μl Deparaffinization Solution, agitați puternic timp de 10 secunde și centrifugați pentru scurt timp pentru a aduce proba în partea de jos a tubului.
5. Incubați la 56 °C timp de 3 minute, apoi lăsați să se răcească timp de 5 minute la temperatura camerei. Dacă se folosește prea puțină Deparaffinization Solution sau dacă este transferată prea multă parafină împreună cu proba, Deparaffinization Solution poate deveni ceroasă sau solidă după răcire. Dacă se întâmplă acest lucru, adăugați Deparaffinization Solution suplimentară în pași de 160 μl și repetați pasul 5.
6. Adăugați ▲ 150 sau ● 240 μl Buffer PKD și omogenați în agitatorul vortex timp de 3 s.
7. Centrifugați timp de 1 min la 11.000 x g.

8. Adăugați 10  $\mu$ l de proteinază K în faza inferioară, limpede și omogenizați pipetând ușor de 10 ori în sus și în jos (nu omogenizați fazele separate).
9. Incubați la 56 °C timp de 15 min la 1.100 rpm, apoi la 80 °C timp de 15 min la 1.100 rpm. Dacă utilizați un singur bloc de încălzire, lăsați proba la temperatura camerei după incubarea acesteia la 56 °C, până când blocul de încălzire atinge 80 °C.  
**Notă:** Digestia completă a țesutului de către proteinaza K nu este obligatorie pentru rezultatul maxim de ARN; cu toate acestea, etapa de incubare la 80 °C este esențială.  
**Important:** Asigurați-vă că blocul de încălzire a atins 80 °C înainte de a începe incubarea timp de 15 minute. Incubarea timp de 15 minute la 80 °C este critică pentru inversarea reticulelor de formaldehidă și performanța optimă a ARN-ului în aplicații din aval, cum ar fi RT-PCR în timp real.
10. Centrifugați pentru scurt timp și transferați ▲ 145 sau ● 230  $\mu$ l din faza inferioară, incoloră, într-un tub nou de microcentrifugare de 1,5 ml.
11. Incubați pe gheață timp de 3 minute. Apoi centrifugați timp de 15 minute la 20.000 x g.
12. Transferați lichidul supernatant într-un tub de centrifugare de 2 ml nou, având grijă să nu afectați peletul.  
Peletul conține resturi de țesut insolubile, inclusiv ADN reticulat.
13. Adăugați DNase Booster Buffer echivalent cu o zecime din volumul total al probei (▲ 14,5 sau ● 23  $\mu$ l) și 10  $\mu$ l soluție standard de DNază I. Omogenizați prin răsturnarea eprubetei. Centrifugați pentru scurt timp pentru a colecta lichidul rezidual de pe părțile laterale ale tubului.  
**Notă:** DNaza I este furnizată în stare liofilizată și trebuie reconstituită așa cum este descris în „Prepararea soluției standard de DNază I”, pagina 16.  
**Notă:** DNaza I este deosebit de sensibilă la denaturare. Omogenizarea trebuie efectuată numai prin răsturnarea ușoară a tubului. Nu agitați în agitatorul vortex.

14. Incubați timp de 15 minute la temperatura camerei.
15. Adăugați ▲ 320 sau ● 500  $\mu$ l Buffer RBC pentru a ajusta condițiile de legare și omogenizați bine lizatul în agitatorul vortex timp de 3 secunde și centrifugați pentru scurt timp.
16. Adăugați ▲ 720  $\mu$ l sau ■ 1200  $\mu$ l etanol (96–100 %) la probă. A nu centrifuga. Treceți imediat la pasul 17.

Precipitatele pot fi vizibile după adăugarea etanolului. Acesta nu afectează procedura.

17. Omogenizați bine pipetând de 5 ori în sus și în jos și transferați 700  $\mu$ l de probă, inclusiv orice precipitat care s-ar fi putut forma, într-o coloană de centrifugare RNeasy MinElute plasată într-un tub de recoltare de 2 ml. Închideți ușor capacul și centrifugați timp de 15 s la  $\geq 8.000 \times g$ . Aruncați tubul de recoltare cu dispozitiv de direcționare a debitului\* și introduceți coloana într-un tub de recoltare nou (furnizat).
18. Repetați pasul 17 (fără omogenizare suplimentară) până când întreaga probă a trecut prin coloana de centrifugare RNeasy MinElute.
19. Adăugați 500  $\mu$ l de Buffer RPE în coloana de centrifugare RNeasy MinElute. Închideți ușor capacul și centrifugați timp de 15 s la  $\geq 8.000 \times g$ . Aruncați tubul de recoltare cu dispozitiv de direcționare a debitului și introduceți coloana într-un tub de recoltare nou (furnizat).

**Notă:** Buffer RPE este livrată sub formă de concentrat. Asigurați-vă că este adăugat etanol înainte de utilizare, așa cum este descris în „Prepararea Buffer RPE”.

\* Dispozitivul de direcționare a debitului conține Buffer RBC și, prin urmare, este incompatibil cu soluțiile de albire. Consultați pagina 8 pentru informații privind siguranța.

20. Adăugați 500 µl de Buffer RPE în coloana de centrifugare RNeasy MinElute. Închideți ușor capacul și centrifugați timp de 2 minute la  $\geq 8.000 \times g$  pentru a spăla membrana coloanei de centrifugare. Aruncați tubul de recoltare cu dispozitiv de direcționare a debitului\* și introduceți coloana într-un tub de recoltare nou (furnizat).

**Notă:** După centrifugare, scoateți cu grijă coloana de centrifugare RNeasy MinElute din tubul de recoltare, astfel încât coloana să nu intre în contact cu dispozitivul de direcționare a debitului. În caz contrar, va avea loc transferul de etanol.

21. Deschideți capacul coloanei de centrifugare și centrifugați la viteză maximă timp de 5 minute. Aruncați tubul de recoltare cu dispozitiv de direcționare a debitului.

Pentru a evita deteriorarea capacelor, introduceți coloanele de centrifugare în centrifugă cu cel puțin o poziție goală între coloane. Orientați capacele în direcția opusă rotației rotorului (de exemplu, dacă rotorul se rotește în sensul acelor de ceasornic, orientați capacele în sens invers acelor de ceasornic).

Este important să uscați membrana coloanei de centrifugare, deoarece etanolul rezidual poate interfera cu reacțiile din aval. Centrifugarea cu capacele deschise se asigură că etanolul nu este transferat în timpul eluției ARN.

22. Introduceți coloana de centrifugare RNeasy MinElute într-un tub de recoltare de 1,5 ml nou (furnizat). Adăugați 14–32 µl apă fără RN-aze direct în centrul membranei coloanei de centrifugare. Închideți ușor capacul și centrifugați timp de 1 minut la viteză maximă pentru a elua ARN-ul.

Eluția cu volume mai mici de apă fără RN-aze duce la concentrații mai mari de ARN total, dar rezultate ARN mai slabe.

**Notă:** Pentru rezultate ARN slabe preconizate, se recomandă un tub Low Bind pentru eluție (nefurnizat). Volumul mort mediu al coloanei de centrifugare RNeasy MinElute este de 2 µl: eluția cu 14 µl de apă fără RN-aze are ca rezultat aproximativ 12 µl de eluat.

\* Dispozitivul de direcționare a debitului conține Buffer RBC și, prin urmare, este incompatibil cu soluțiile de albire. Consultați pagina 8 pentru informații privind siguranța.

23. Depozitați eluatele de ARN între -60 și -90 °C sau între -15 și -30 °C timp de până la 12 săptămâni.

**Notă:** Stabilitatea eluatului va depinde de conținutul și tipul de ARN izolat, volumul de eluție și condițiile de depozitare. Le recomandăm utilizatorilor să stabilească stabilitatea eluatului după cum este necesar pentru cerințele lor particulare.

## Controlul calității

În conformitate cu sistemul de management al calității certificat ISO al QIAGEN, fiecare lot de RNeasy DSP FFPE Kit este testat pentru specificațiile prestabilite, pentru a asigura calitatea constantă a produsului.

## Limitări

Performanța sistemului a fost stabilită prin studii de evaluare a performanței de purificare a ARN-ului uman din probe fixate în formol și înglobate în parafină.

Validarea performanței sistemului pentru orice proceduri utilizate în laborator care nu fac obiectul studiilor de evaluare a performanței efectuate de QIAGEN constituie răspunderea utilizatorului.

Pentru a reduce la minimum riscul de impact negativ asupra rezultatelor de diagnostic, trebuie utilizate substanțe de control adecvate pentru aplicațiile din aval.

Orice rezultate de diagnostic care sunt generate trebuie interpretate în coroborare cu alte rezultate clinice sau de laborator.

## Caracteristici de performanță

Caracteristicile de performanță aplicabile pot fi găsite în fila „Resources” (Resurse) pe pagina produsului, la adresa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).



# Eliminare

Deșeurile conțin probe și reactivi. Aceste deșeuri pot conține materiale toxice sau infecțioase și trebuie eliminate corespunzător. Consultați reglementările locale de siguranță pentru procedurile de eliminare corespunzătoare.

Pentru informații suplimentare, vă rugăm să consultați fișele cu date de securitate (Safety Data Sheet, SDS) corespunzătoare. Acestea sunt disponibile online în format PDF la adresa [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), unde puteți găsi, vizualiza și tipări fișa SDS pentru fiecare kit QIAGEN și pentru componentele kiturilor.

# Ghid de depanare

Acest ghid de depanare poate fi util în rezolvarea oricăror probleme care pot apărea. Pentru informații suplimentare, a se vedea și pagina „Întrebări frecvente” din cadrul Centrului nostru pentru Asistență Tehnică: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Cercetătorii din cadrul Serviciilor tehnice QIAGEN vă stau întotdeauna la dispoziție pentru a răspunde la orice întrebări pe care le aveți despre informațiile și/sau protocoalele din acest manual sau probă, precum și despre tehnologiile de prelevare și testare (pentru datele de contact, vizitați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Comentarii și sugestii

---

### Coloană de centrifugare RNeasy MinElute colmatată

- |    |  |   |
|----|--|---|
| a) | Prea mult material inițial               | Reduceți cantitatea de material inițial. Este esențial să folosiți cantitatea corectă de material inițial (consultați pagina 15).   |
| b) | Temperatură de centrifugare prea scăzută | Temperatura de centrifugare trebuie să fie de 15–25 °C. Unele centrifuge se pot răci sub 15 °C chiar și atunci când sunt setate la 20°C. Acest lucru poate cauza formarea de precipitate care pot colmata coloana de centrifugare RNeasy MinElute. Dacă se întâmplă acest lucru, setați temperatura de centrifugare la 25 °C. |
- 

### Rezultat ARN slab

- |    |  |  |
|----|--|--|
| a) | Calitate slabă a materialului inițial                                  | Probele care au fost fixate mai mult de 24 de ore sau au fost depozitate pe perioade foarte lungi pot conține foarte puțin ARN utilizabil.<br>Secțiunile care au fost montate pe lamele de microscop pot produce foarte puțin ARN utilizabil, din cauza expunerii prelungite la aer. |
| b) | Prea mult material inițial   | Supraîncărcarea coloanei de centrifugare RNeasy MinElute reduce semnificativ rezultatele acidului nucleic. Reduceți cantitatea de material inițial (consultați pagina 15).   |
| c) | ARN-ul încă legat de membrana coloanei de centrifugare RNeasy MinElute | Repetăți eluția ARN, dar incubați coloana de centrifugare RNeasy Min Elute pe bancul de lucru timp de 10 minute cu RNFV înainte de centrifugare.   |

## Comentarii și sugestii

- |   |   |
|---|---|
| d) Depozitare greșită a soluțiilor tampon/reactivilor | Coloanele de centrifugare RNeasy MinElute, precum și DNase I, trebuie păstrate la 2–8 °C la sosirea kitului. Verificați temperatura corectă de depozitare, deoarece expunerea la temperaturi mai ridicate pentru perioade mai lungi de timp poate duce la pierderea funcționalității. |
|---|---|

### Valoare $A_{260}/A_{280}$ scăzută

Apa folosită pentru diluarea acidului nucleic pentru măsurarea $A_{260}/A_{280}$	Utilizați 10 mM Tris Cl, pH 7,5, nu apă, pentru a dilua proba înainte de măsurarea purității.
--	---

### Contaminarea ADN-ului în experimentele din aval

- |  |  |
|--|--|
| a) Prea mult material inițial                          | Pentru unele tipuri de țesut, eficiența îndepărtării ADN-ului poate fi redusă la procesarea unor cantități foarte mari. Dacă ARN-ul eluat conține o contaminare substanțială cu ADN, încercați să procesați mai puține secțiuni de țesut per preparat.   |
| b) Țesutul are un conținut ridicat de ADN              | La procesarea unor cantități foarte mari de țesuturi bogate în ADN (de exemplu, timus), este posibil ca ADN-ul să nu fie complet digerat. Repetați procedura de purificare folosind mai puține secțiuni de țesut.<br>Verificați dacă DNaza I a fost depozitată corect așa cum este descris în „Depozitarea și manipularea reactivilor” și „Prepararea soluției standard de DNază I”. |
| c) Revers-transcriere cu cantitate insuficientă de ARN | Majoritatea revers-transcriptazelor sunt destinate utilizării cu aproximativ 1 μg de ARN. Dacă se efectuează revers-transcriere cu cantități foarte mici de ARN, vă recomandăm să utilizați o revers-transcriptază care este special concepută pentru revers-transcriere foarte sensibilă.   |

### ARN-ul nu se comportă bine în testele/aplicațiile din aval

- |  |   |
|--|---|
| a) ARN fragmentat sau blocat din cauza modificării în formaldehidă | Incubarea la 80 °C în procedura RNeasy DSP FFPE este esențială pentru performanța optimă a ARN în revers-transcriere și alte aplicații enzimatice din aval. Asigurați-vă că temperatura de incubare este menținută la 80 °C pe parcursul întregului timp de incubare de 15 minute.<br>Deși incubarea la 80 °C elimină unele dintre modificările în formaldehidă, ARN-ul purificat din secțiunile FFPE nu este un șablon optim pentru reacțiile enzimatice. Vă recomandăm să utilizați numai soluții de amorsare aleatorii sau soluții de amorsare specifice genei pentru sinteza ADN-ului complementar. De asemenea, vă recomandăm să păstrați ampliconii cât mai scurți posibil pentru PCR (< 500 nucleotide). |
|--|---|












## Comentarii și sugestii








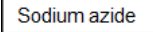

---

- b) Transfer de etanol      În timpul celei de-a doua spălări cu Buffer RPE, asigurați-vă că ați centrifugat la  $\geq 8.000 \times g$  timp de 2 minute la 15–25 °C pentru a usca membrana coloanei de centrifugare RNeasy MinElute. După centrifugare, scoateți cu grijă coloana din tubul de recoltare, astfel încât coloana să nu intre în contact cu dispozitivul de direcționare a debitului. Apoi, introduceți coloana într-un tub de recoltare nou și centrifugați la viteză maximă timp de 5 minute.
- c) Transferul de sare în timpul eluției ARN      Asigurați-vă că Buffer RPE a fost reconstituit prin adăugarea volumului corect de etanol și că soluția tampon este la temperatura camerei (15-25 °C).
- d) Revers-transcriere cu cantitate insuficientă de ARN      Majoritatea revers-transcriptazelor sunt destinate utilizării cu aproximativ 1 µg de ARN. Dacă se efectuează revers-transcriere cu cantități foarte mici de ARN, vă recomandăm să utilizați o revers-transcriptază care este special concepută pentru revers-transcriere foarte sensibilă.

# Simboluri

În instrucțiunile de utilizare sau pe ambalaj și pe etichete pot apărea următoarele simboluri:

Simbol	Definiția simbolului
	Conține reactivi suficienți pentru <N> reacții
	Data de expirare
	Acest produs îndeplinește cerințele Regulamentului european 2017/746 privind dispozitivele medicale pentru diagnostic in vitro.
	Dispozitiv medical pentru diagnostic in vitro
	La sosire
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Număr de catalog
	Număr de lot
	Număr de material (adică eticheta componentei)
	Componente (adică lista de componente incluse)
	Conține (conținut)

Simbol	Definiția simbolului
	Număr (adică fiole, flacoane)
	Numărul global de articol comercial (GTIN)
Rn	R reprezintă revizuirea Instrucțiunilor de utilizare (manual), iar n este numărul revizuirii
	Limită de temperatură
	Producător
	Consultați instrucțiunile de utilizare
	Atenție
	Proteinase K
	Azidă de sodiu
	Identificator unic dispozitiv

## Date de contact

Pentru asistență tehnică și informații suplimentare, consultați Centrul nostru pentru Asistență Tehnică la adresa [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support), apelați numărul de telefon 00800-22-44-6000 sau contactați Departamentele de Servicii Tehnice ale QIAGEN sau distribuitorii locali (a se vedea coperta a patra sau vizitați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Anexă: Observații generale privind manipularea ARN

## Manipularea ARN-ului

Ribonucleazele (RN-aze) sunt enzime foarte stabile și active care, în general, nu au nevoie de cofactori pentru a funcționa. Deoarece RN-azele sunt dificil de inactivat, iar pentru distrugerea ARN-ului sunt suficiente chiar și cantități infime, nu utilizați nici un material din plastic sau sticlă fără a elimina mai întâi o posibilă contaminare cu RN-aze. Trebuie să evitați cu mare atenție introducerea din greșeală a RN-azelor în proba de ARN în timpul sau după procedura de purificare. Pentru a crea și a menține un mediu lipsit de RN-aze, trebuie luate următoarele măsuri de precauție în timpul pretratării și al utilizării recipientelor și soluțiilor (de unică folosință sau nu) atunci când se lucrează cu ARN.

## Manipularea generală

Atunci când se lucrează cu ARN, trebuie să se utilizeze întotdeauna o tehnică microbiologică aseptică adecvată. Măinile și particulele de praf pot fi purtătoare de bacterii și mușcături și sunt cele mai frecvente surse de contaminare cu RN-aze. Purtați întotdeauna mănuși de latex sau de vinil în timpul manipulării reactivilor și a probelor de ARN pentru a preveni contaminarea cu RN-aze de la suprafața pielii sau de la echipamentul de laborator prăfuit. Schimbați frecvent mănușile și țineți eprubetele închise ori de câte ori este posibil. Păstrați ARN purificat pe gheață atunci când părțile alicote sunt pipetate pentru aplicații în aval.



Pentru a elimina contaminarea cu RN-aze de pe suprafețele bancului, componentele din plastic de unică folosință și echipamentele de laborator (de exemplu, pipete și rezervoare de electroforeză), se recomandă RNaseZap® (nr. cat. AM9780) de la Ambion®. Contaminarea cu RN-aze poate fi eliminată alternativ folosind reactivi generici de laborator. Pentru a decontamina componentele din plastic, clătiți cu 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA urmat de apă fără RN-aze (consultați „Soluții”, pagina 34) sau clătiți cu cloroform, în cazul în care componentele din plastic sunt rezistente la cloroform. Pentru a decontamina rezervoarele de electroforeză, curățați cu detergent (de exemplu, 0,5% SDS), clătiți cu apă fără RN-aze, clătiți cu etanol (dacă rezervoarele sunt rezistente la etanol) și lăsați să se usuce.

### Componente din plastic de unică folosință

Se recomandă utilizarea tuburilor din polipropilenă sterile, de unică folosință, pe tot parcursul procedurii. Aceste tuburi nu conțin în general RN-aze și nu necesită un pretratament pentru a inactiva RN-azele.

### Componente din sticlă

Componentele din sticlă trebuie tratate înainte de utilizare pentru a se asigura că nu conțin RN-aze. Componentele din sticlă folosite pentru lucrul cu ARN trebuie curățate cu un detergent, clătite bine și ținute la cuptor la 240 °C timp de cel puțin 4 ore (peste noapte, dacă este mai comod) înainte de utilizare. Doar autoclavizarea nu va inactiva complet multe RN-aze. Alternativ, componentele din sticlă pot fi tratate cu DEPC (pirocarbonat de dietil), așa cum este descris în secțiunea „Soluții” de mai jos.

## Soluții

Soluțiile (apă și alte soluții) trebuie tratate cu DEPC 0,1 %. DEPC este un inhibitor puternic, dar nu absolut, al RN-azelor. Este folosit în mod obișnuit la o concentrație de 0,1 % pentru a inactiva RN-azele pe articole din sticlă sau plastic sau pentru a crea soluții și apă fără RN-aze. DEPC inactivează RN-azele prin modificare covalentă. Adăugați 0,1 ml DEPC la 100 ml din soluția de tratat și agitați puternic pentru a aduce DEPC în soluție. Lăsați soluția să incubeze timp de 12 ore la 37 °C. Autoclavați timp de 15 minute pentru a îndepărta orice urmă de DEPC. DEPC va reacționa cu aminele primare și nu poate fi utilizat direct pentru a trata soluțiile tampon Tris. DEPC este foarte instabil în prezența soluțiilor tampon Tris și se descompune rapid în etanol și CO<sub>2</sub>. Când pregătiți soluții tampon Tris, tratați mai întâi apa cu DEPC și apoi dizolvați Tris pentru a face soluția tampon corespunzătoare. Urmele de DEPC vor modifica resturile de purină din ARN prin carboxilare. ARN-ul carboxilat este translatat cu o eficiență foarte scăzută în sistemele acelulare. Cu toate acestea, capacitatea sa de a forma hibrizi ADN:ARN sau ARN:ARN nu este afectată grav decât dacă o mare parte a resturilor de purină a fost modificată. DEPC rezidual trebuie întotdeauna eliminat din soluții sau vase prin autoclavizare sau încălzire la 100 °C timp de 15 minute.

**Notă:** Soluțiile tampon RNeasy sunt garantate fără RN-aze fără a utiliza tratamentul cu DEPC și, prin urmare, sunt lipsite de orice contaminare cu DEPC.

## Informații pentru comandă

Produs	Cuprins	Nr. cat.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Columns, Elution Tubes, Wash Tubes, Lysis Tubes, RNase-free Reagents și Buffers	73604

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 kiturile QIAGEN sunt disponibile pe [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) sau pot fi solicitate de la Serviciile tehnice QIAGEN sau distribuitorul dumneavoastră local.

# Istoricul revizuirilor documentului

Revizuire	Descriere
R1, iunie 2022	<p>S-a actualizat la versiunea 2 a kitului pentru îndeplinirea cerințelor Regulamentului privind dispozitivele medicale pentru diagnostic in vitro. Nu s-au adus modificări protocoalelor sau performanței în comparație cu versiunea 1 a kitului</p> <p>Actualizarea secțiunii Avertismente și precauții (adăugarea riscurilor reziduale, a informațiilor pentru situații de urgență)</p> <p>Adăugarea secțiunii Eliminarea</p>

#### Acord de licență limitată pentru RNeasy DSP FFPE Kit

Utilizarea acestui produs înseamnă acceptarea următorilor termeni de către orice cumpărător sau utilizator al produsului:

1. Produsul poate fi utilizat doar în conformitate cu protocoalele furnizate împreună cu produsul și prezentul manual și doar împreună cu componentele incluse în kit. QIAGEN nu acordă nicio licență pentru niciuna dintre proprietățile sale intelectuale în vederea utilizării sau încorporării componentelor incluse în acest kit cu orice componentă care nu este inclusă în acest kit, dacă nu este precizat astfel în protocoalele furnizate împreună cu produsul, în prezentul manual și în protocoalele suplimentare disponibile la adresa [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Unele dintre aceste protocoale suplimentare au fost furnizate de utilizatorii QIAGEN pentru utilizatorii QIAGEN. Aceste protocoale nu au fost testate riguros sau optimizate de QIAGEN. QIAGEN nu le garantează și nici nu asigură faptul că acestea nu încalcă drepturile terților.
1. În afară de licențele acordate în mod explicit, QIAGEN nu garantează sub nicio formă că această trusă și/sau utilizarea (utilizările) acesteia nu încalcă drepturile terților.
2. Acest kit și componentele sale sunt licențiate pentru o singură utilizare și nu pot fi reutilizate, recondiționate sau revândute.
3. QIAGEN declină în mod specific orice licențe, explicite sau implicite, altele decât cele declarate în mod explicit.
4. Cumpărătorul și utilizatorul kitului acceptă să nu ia măsuri și să nu permită niciunei persoane să ia măsuri care ar putea conduce la sau facilita oricare dintre faptele interzise prezentate mai sus. QIAGEN poate pune în aplicare interdicțiile din acest Acord de licență limitată în orice instanță și va recupera toate costurile anchetelor și cheltuielile de judecată, inclusiv onorariile avocaților, în orice acțiune pentru aplicarea acestui Acord de licență limitată sau a oricăruia dintre drepturile sale de proprietate intelectuală legate de kit și/sau componentele acestuia.

Pentru clauzele de licență actualizate, consultați [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Mărci comerciale: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific sau sucursalele acesteia). Denumirile înregistrate, mărcile comerciale etc. utilizate în documentul de față, chiar dacă nu sunt marcate în mod specific, sunt protejate prin lege. 06/2022 HB-3027-001 1127532 © 2022 QIAGEN, toate drepturile rezervate.

