

Dezember 2017

QIASymphony[®] SP Protokollblatt

Tissue_LC_200_V7_DSP und Tissue_HC_200_V7_DS

Das vorliegende Dokument ist das Tissue_LC_200_V7_DSP und Tissue_HC_200_V7_DSP QIASymphony SP Protokollblatt, R3, für den QIASymphony DSP DNA Mini Kit, Version 1.

Allgemeine Informationen

Der QIASymphony DSP DNA Kit ist für den in-vitro-diagnostischen Gebrauch vorgesehen.

Diese Protokolle wurden für die Reinigung von Gesamt-DNA aus Gewebe und formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE-)Gewebeproben mithilfe des QIASymphony® SP und des QIASymphony DSP DNA Mini Kits entwickelt.

Je nach Probenart empfehlen wir, entweder das Low-Content- (LC-) oder High-Content-(HC) Protokoll zu verwenden. Aus Gewebeproben werden bei Anwendung des High-Content-Protokolls höhere DNA-Ausbeuten erhalten; das Low-Content-Protokoll kann dagegen in Kombination mit einem kleinen Elutionsvolumen (50 µl) verwendet werden, wenn eine hohe DNA-Konzentration erforderlich ist. Für FFPE-Gewebeproben empfehlen wir das Low-Content-Protokoll.

Low-Content-Protokoll

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Kat.-Nr. 937236)
Probenmaterial	FFPE-Gewebeproben und Gewebe* Bis zu 4 FFPE-Gewebeschnitte, jeweils mit einer Dicke von bis zu 10 µm, oder 8 Schnitte mit einer Dicke von bis zu 5 µm, und einer Fläche von bis zu 250 mm ² können bei einer Präparation parallel verarbeitet werden.
Protokollname	Tissue_LC_200_V7_DSP
Standard-Assay-Kontroll-Set	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elutionsvolumen	50 µl, 100 µl, 200 µl oder 400 µl
Erforderliche Software-Version	Version 4.0 oder höher

* Siehe das High-Content-Protokoll für weitere Informationen zu den Gewebeproben.

High-Content-Protokoll

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Kat.-Nr. 937236)
Probenmaterial	Gewebe Falls keine Angaben über die zu erwartende Ausbeute verfügbar sind, empfehlen wir, mit 25 mg Probenmaterial zu beginnen. Je nach erhaltener Ausbeute kann die Probenmenge in nachfolgenden Präparationen erhöht werden.
Protokollname	Tissue_HC_200_V7_DSP
Standard-Assay-Kontroll-Set	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elutionsvolumen	100 µl, 200 µl oder 400 µl
Erforderliche Software-Version	Version 4.0 oder höher

Vom Anwender bereitzustellende Ausrüstung und Reagenzien

Für alle Probentypen

- Puffer ATL, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, Kat.-Nr. 939016)
- Zur Minimierung des RNA-Gehalts: DNase-freie RNase A (Stammlösung von 100 mg/ml)

Für FFPE-Gewebeprobe (Entparaffinierung ohne Xylol)

- Entparaffinierungslösung (Deparaffinization Solution, Kat.-Nr. 939018)

Für FFPE-Gewebeprobe (Entparaffinierung mit Xylol)

- Xylol (99–100 %)
- Ethanol (96–100 %) *

„Proben“-Schublade

Probentyp	FFPE-Gewebeprobe und Gewebe
Ausgangs-Probenvolumen	220 µl (pro Probe und pro Protokoll erforderlich) [†]
Verarbeitetes Probenvolumen	200 µl
Primärprobenröhrchen	n. z.
Sekundärprobenröhrchen	Weitere Informationen siehe www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Einsätze	Hängt vom verwendeten Probenröhrchen ab; weitere Informationen siehe www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] Für Protokolle sowohl für hohen als auch für niedrigen Gehalt erkennt das System nicht, ob das Probenvolumen geringer als 220 µl ist, weil die Überführung der Probe ohne Füllstandsdetektion erfolgt. Stellen Sie deshalb sicher, dass das Probeneinsatzvolumen 220 µl beträgt.

n. z. = nicht zutreffend

Reagenzien und Verbrauchsartikel“-Schublade

Position A1 und/oder A2	Reagenzienkartusche
Position B1	n. z.
Tip-Rack-Halter 1–17	Einmal-Filterpipettenspitzen, 200 µl oder 1500 µl
Container-Halter 1–4	Container mit Probenverarbeitungseinsätzen oder 8-Magnetstab-Schutzhülsen

n. z. = nicht zutreffend

* Verwenden Sie keinen vergällten Alkohol, der zusätzliche Substanzen, wie z. B. Methanol oder Methyläthylketon, enthält.

„Abfall“-Schublade

Container-Halter 1–4	Leere Verbrauchsartikel-Container
Abfallbeutel-Halter	Abfallbeutel
Flüssigabfallflaschen-Halter	Leere Flüssigabfallflasche

„Eluat“-Schublade

Elutions-Rack (wir empfehlen, Stellplatz 1 – die Kühlposition – zu verwenden)	Weitere Informationen siehe www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
--	--

Benötigte Kunststoff-Verbrauchsartikel

Kunststoff-Verbrauchsartikel	Eine Proben-Charge, 24 Proben*	Zwei Proben-Chargen, 48 Proben*	Drei Proben-Chargen, 72 Proben*	Vier Proben-Chargen, 96 Proben*
Einmal-Filterpipettenspitzen, 200 µl ^{††}	26	50	74	98
Einmal-Filterpipettenspitzen, 1500 µl ^{††}	72	136	200	264
Probenverarbeitungs-Einsätze [§]	21	42	63	84
8-Magnetstab-Schutzhülsen [¶]	3	6	9	12

* Bei Verarbeitung von weniger als 24 Proben pro Charge verringert sich die Anzahl der pro Lauf benötigten Einmal-Filterpipettenspitzen entsprechend.

[†] Ein Tip-Rack enthält 32 Filter-Pipettenspitzen.

^{††} Bei der Anzahl der benötigten Filter-Pipettenspitzen sind die Spitzen für einen Inventar-Scan pro Reagenzienkartusche berücksichtigt.

[§] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält 28 Probenverarbeitungs-Einsätze.

[¶] Ein Verbrauchsartikel-Container enthält zwölf 8-Magnetstab-Schutzhülsen

Hinweis: Die angegebene Anzahl Filter-Pipettenspitzen kann, in Abhängigkeit von den Einstellungen, von der im Touchscreen-Display angezeigten Anzahl abweichen. Wir empfehlen, die maximal mögliche Anzahl Pipettenspitzen zu laden.

Elutionsvolumen

Das Elutionsvolumen wird im Touchscreen-Display ausgewählt. In Abhängigkeit von Proben- und DNA-Gehalt kann das endgültige Eluatvolumen um bis zu 15 µl kleiner sein als das gewählte Volumen. Aufgrund der Tatsache, dass das Eluatvolumen variieren kann, empfehlen wir, das tatsächliche Eluatvolumen zu kontrollieren, wenn Sie ein automatisiertes System für das Assay-Setup verwenden, bei dem das Eluatvolumen nicht vor dem Transfer bestimmt wird. Bei Elution in geringeren Volumina erhöht sich die DNA-Endkonzentration, jedoch verringert sich dadurch die Ausbeute etwas. Wir empfehlen, ein Elutionsvolumen zu verwenden, das für die vorgesehene nachfolgende Applikation geeignet ist.

Vorbereitung des Probenmaterials

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien immer einen Laborkittel, Schutzhandschuhe und eine Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (Safety Data Sheets, SDSs) entnehmen, die Sie vom jeweiligen Hersteller beziehen können.

Wichtiger Hinweis vor Beginn

- Die QIASymphony Magnetpartikel reinigen RNA und DNA gemeinsam auf, wenn beide in der Probe vorhanden sind. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie beim entsprechenden Schritt im Vorbehandlungsprotokoll RNase A zu der Probe hinzu.

Weitere wichtige Hinweise, bevor Sie mit dem Protokoll beginnen

- Überprüfen Sie, ob sich im Puffer ATL ein weißer Niederschlag befindet. Falls erforderlich, inkubieren Sie den Puffer unter gelegentlichem Schütteln für 30 Minuten bei 37 °C, um das Präzipitat aufzulösen.
- Stellen Sie einen Thermomixer® oder einen Schüttelinkubator auf die erforderliche Temperatur für die jeweilige Vorbehandlung ein.*

Gewebe

Sowohl frische als auch gefrorene Gewebeproben können für die DNA-Reinigung verwendet werden. DNA-Ausbeute und Qualität hängt vom Gewebetyp, der Herkunft und der Lagerungsbedingungen ab. Frisches Gewebe kann vor der Verarbeitung in kleine Stücke geschnitten und bei –20 °C oder –80 °C gelagert werden. Generell empfehlen wir, das High-Content-Protokoll zu verwenden, mit dem höhere DNA-Ausbeuten erhalten werden. Das Low-Content-Protokoll, in Kombination mit 50 µl als Elutionsvolumen, wird nur empfohlen, wenn hohe DNA-Konzentrationen für die im Anschluss durchgeführte Analyse benötigt werden. Liegt keine Information über die zu erwartende Ausbeute vor, empfehlen wir, mit 25 mg Probenmaterial unter Verwendung des High-Content-Protokolls und 200 µl als Elutionsvolumen zu beginnen. Je nach erhaltener Ausbeute können Sie bei nachfolgenden Präparationen größere Proben verwenden oder das Elutionsvolumen verringern. Beachten Sie dabei, dass es bei überladenen Präparationen in Kombination mit zu kleinem Elutionsvolumen zu einer Verschleppung von Magnet-Partikeln in das Eluat kommen kann, wodurch die Reinheit der DNA und nachfolgende Analysen beeinträchtigt sein könnten.

* Stellen Sie sicher, dass die Geräte regelmäßig und gemäß den Herstellerangaben überprüft, gewartet und kalibriert werden.

Protokoll: Vorbehandlung von Gewebeproben

1. Überführen Sie die Gewebeprobe in ein 2-ml-Mikrozentrifugen-Röhrchen (nicht mitgeliefert).
2. Geben Sie 220 µl Puffer ATL hinzu.
3. Pipettieren Sie 20 µl Proteinase K hinzu und mischen Sie, indem Sie das Röhrchen leicht anschnippen.

Hinweis: Verwenden Sie die Proteinase K aus dem Enzym-Rack des QIASymphony DSP DNA Mini Kits.

4. Stellen Sie das die Röhrchen in einen ThermoMixer oder Schüttelinkubator und inkubieren Sie bei 56 °C unter Schütteln bei 900 U/min, bis das Gewebe vollständig lysiert ist.

Hinweis: Die Lysezeit variiert in Abhängigkeit von dem verarbeiteten Gewebetyp. Bei den meisten Geweben ist die Lyse innerhalb von 3 Stunden abgeschlossen. Falls die Lyse nach 3 Stunden noch nicht vollständig sein sollte – zu erkennen ist dies an der Anwesenheit von unlöslichem Material oder an einem hochviskosen Lysat –, können Sie die Lysezeit verlängern bzw. das unlösliche Material durch Zentrifugation, wie in Schritt 6 beschrieben, entfernen. Auch die Lyse über Nacht ist möglich und beeinträchtigt nicht die DNA-Präparation.

5. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie 4 µl RNase A (100 mg/ml) hinzu und inkubieren Sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur (15 bis 25 °C), bevor Sie mit Schritt 6 fortfahren.
6. Homogenisieren Sie die Probe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren.
7. Überführen Sie 220 µl des Überstands vorsichtig in Probenröhrchen, die in das Röhrchen-Gestell des QIASymphony SP eingesetzt werden können.

Eine vollständige Liste der kompatiblen Probenröhrchen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphanbooks. Wir empfehlen, 2-ml-Röhrchen (z. B. Kat.-Nr. 72.693 oder 72.608 von Sarstedt®) zu benutzen

FFPE-Gewebeproben

Standardmethoden der Formalinfixierung und Paraffineinbettung führen immer zu einer erheblichen Fragmentation der Nukleinsäuren. Um das Ausmaß der DNA-Fragmentation zu begrenzen, sollten Sie daher folgende Punkte unbedingt beachten:

- Fixieren Sie die Gewebeproben so schnell wie möglich nach der chirurgischen Entnahme in 4- bis 10%igem Formalin.

- Fixieren Sie für 14–24 Stunden (noch längere Fixierungszeiten führen zu stärkerer DNA-Fragmentation, was wiederum eine schwache Performance in nachfolgenden Assays nach sich zieht).
- Dehydrieren Sie die Proben vor der Einbettung gründlich (Reste von Formalin können den Verdau mit Proteinase K inhibieren)

Als Ausgangsmaterial für die DNA-Reinigung sollten frische FFPE-Gewebeschnitte verwendet werden. Bis zu 4 Schnitte, jeweils mit einer Dicke von bis zu 10 µm, oder 8 Schnitte mit einer Dicke von bis zu 5 µm, und einer Fläche von bis zu 250 mm² können bei einer Präparation parallel verarbeitet werden. Falls Sie keine näheren Angaben über den DNA-Gehalt des Ausgangsmaterials haben, empfehlen wir, mit höchstens 3 Gewebeschnitten bei einer DNA-Präparation zu beginnen. In Abhängigkeit von der DNA-Ausbeute und -Reinheit können Sie dann in nachfolgenden Präparationen bis zu 8 Gewebeschnitte verarbeiten.

Hinweis: Die FFPE Gewebeprotokolle sind besonders dazu ausgelegt, nur geringe RNA-Mengen mit aufzureinigen. Dies führt zu einem reduzierten photometrischen Messwert im Vergleich zu den Werten, die mit dem manuellen QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit erhalten werden.

Protokoll: Vorbehandlung von FFPE-Gewebeproben

Verfahren 1: Entparaffinisierung mit Entparaffinisierungslösung

1. Schneiden Sie mithilfe eines Skalpells überschüssiges Paraffin vom Probenblock ab.
2. Schneiden Sie bis zu 4 Gewebeschnitte von 10 µm Dicke oder bis zu 8 Schnitte von 5 µm Dicke.

Hinweis: Falls die Probe an der Oberfläche der Luft ausgesetzt war, verwerfen Sie die ersten zwei oder drei Schnitte.

3. Überführen Sie die Gewebeschnitte in ein 2-ml-Röhrchen der Fa. Sarstedt (Kat.-Nr. 72.693 oder 72.608; nicht mitgeliefert), das mit dem Röhrchen-Gestell des QIA Symphony SP kompatibel ist.
4. Geben Sie 200 µl Puffer ATL zu den Schnitten.
5. Pipettieren Sie 20 µl Proteinase K hinzu.

Hinweis: Verwenden Sie die Proteinase K aus dem Enzym-Rack des QIA Symphony DSP DNA Mini Kits.

6. Geben Sie 160 µl oder 320 µl Entparaffinierungslösung hinzu (siehe folgende Tabelle) und mischen Sie auf einem Laborschüttler (Vortex)

Schnittdicke	Anzahl der Schnitte	Volumen Entparaffinierungslösung
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Setzen Sie das Röhrchen in einen Thermomixer oder Schüttelinkubator und inkubieren Sie für 1 Stunde bei 56 °C unter Schütteln bei 1000 UpM, bis das Gewebe vollständig lysiert ist.

Hinweis: Die Lysezeit variiert in Abhängigkeit von dem verarbeiteten Gewebetyp. Bei den meisten Geweben ist die Lyse innerhalb von einer Stunde abgeschlossen. Falls die Lyse nach einer Stunde noch nicht vollständig sein sollte – zu erkennen ist dies an der Anwesenheit von unlöslichem Material oder an einem hochviskosen Lysat –, können Sie die Lysezeit verlängern bzw. das unlösliche Material durch Zentrifugation, wie in Schritt 10 beschrieben, pelletieren. Auch die Lyse über Nacht ist möglich und beeinträchtigt nicht die DNA-Präparation.

8. Inkubieren Sie für 1 Stunde bei 90 °C.

Hinweis: Die Inkubation bei 90 °C in Puffer ATL macht die Modifikation der Nukleinsäuren durch das Formaldehyd zum Teil rückgängig. Längere Inkubationszeiten oder höhere Inkubationstemperaturen führen eventuell jedoch zu stärker fragmentierter DNA. Falls Sie nur einen Heizblock verwenden, lassen Sie die Probe nach der Inkubation bei 56 °C bei Raumtemperatur stehen, bis der Heizblock auf 90 °C aufgeheizt ist.

9. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie 2 µl RNase A (100 mg/ml) zu der unteren Phase hinzu und inkubieren Sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur, bevor Sie mit Schritt 10 fortfahren. Lassen Sie die Probe auf Raumtemperatur abkühlen, bevor Sie RNase A hinzufügen.
10. Zentrifugieren Sie bei Raumtemperatur für 1 Minute bei maximaler Drehzahl.
11. Setzen Sie die Röhrchen (mit beiden Phasen) vorsichtig in das Röhrchen-Gestell des QIASymphony SP ein.

Verfahren 2: Entparaffinisierung mit Xylol

- Schneiden Sie mithilfe eines Skalpells überschüssiges Paraffin vom Probenblock ab.
- Schneiden Sie bis zu 4 Gewebeschnitte von 10 µm Dicke oder bis zu 8 Schnitte von 5 µm Dicke.

Hinweis: Falls die Probe an der Oberfläche der Luft ausgesetzt war, werfen Sie die ersten zwei oder drei Schnitte.

3. Überführen Sie die Gewebeschnitte anschließend sofort in ein 1,5-ml- oder 2-ml-Mikrozentrifugen-Röhrchen (nicht mitgeliefert) und pipettieren Sie 1 ml Xylol zur Probe. Schließen Sie den Deckel und mischen Sie kräftig für 10 Sekunden auf einem Laborschüttler (Vortex).
4. Zentrifugieren Sie bei Raumtemperatur für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl.
5. Entnehmen Sie den Überstand vorsichtig mithilfe einer Pipette, ohne einen Teil des Pellets mit aufzusaugen.
6. Geben Sie 1 ml Ethanol (96–100 %) zum Pellet und mischen Sie auf einem Laborschüttler (Vortex).
Hinweis: Mit dem Ethanol werden Xylolreste aus der Probe extrahiert.
7. Zentrifugieren Sie bei Raumtemperatur für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl.
8. Entnehmen Sie den Überstand vorsichtig mithilfe einer Pipette, ohne einen Teil des Pellets mit aufzusaugen.
Hinweis: Saugen Sie vorsichtig vorhandene Ethanolreste mithilfe einer feinen Pipettenspitze ab.
9. Öffnen Sie das Röhrchen und inkubieren Sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur (15–25 °C) bzw. die Ethanolreste verdampft sind.
Hinweis: Diese Inkubation kann bei Temperaturen von bis zu 37 °C erfolgen.
10. Resuspendieren Sie das Pellet in 220 µl Puffer ATL.
11. Pipettieren Sie 20 µl Proteinase K hinzu und mischen Sie auf einem Laborschüttler (Vortex).
Hinweis: Verwenden Sie die Proteinase K aus dem Enzym-Rack des QIASymphony DSP DNA Mini Kits.
12. Inkubieren für 1 Stunde (bzw. bis die Probe vollständig lysiert ist) bei 56 °C.
Hinweis: Die Lysezeit variiert in Abhängigkeit von dem verarbeiteten Gewebetyp. Bei den meisten Geweben ist die Lyse innerhalb von einer Stunde abgeschlossen. Falls die Lyse nach einer Stunde noch nicht vollständig sein sollte – zu erkennen ist dies an der Anwesenheit von unlöslichem Material oder an einem hochviskosen Lysat –, können Sie die Lysezeit verlängern bzw. das unlösliche Material durch Zentrifugation, wie in Schritt 16 beschrieben, entfernen. Auch die Lyse über Nacht ist möglich und beeinträchtigt nicht die DNA-Präparation.
13. Inkubieren Sie für 1 Stunde bei 90 °C.
Hinweis: Die Inkubation bei 90 °C in Puffer ATL macht die Modifikation der Nukleinsäuren durch das Formaldehyd zum Teil rückgängig. Längere Inkubationszeiten oder höhere Inkubationstemperaturen führen eventuell jedoch zu stärker fragmentierter DNA. Falls Sie nur einen Heizblock verwenden, lassen Sie die Probe nach der Inkubation bei 56 °C bei Raumtemperatur stehen, bis der Heizblock auf 90 °C aufgeheizt ist.

14. Zentrifugieren Sie die Probe kurz, um Tröpfchen aus dem Deckelinneren mit der übrigen Flüssigkeit zu vereinigen
15. Zum Minimieren des RNA-Gehalts in der Probe, geben Sie 2 µl RNase A (100 mg/ml) hinzu und inkubieren Sie für 2 Minuten bei Raumtemperatur, bevor Sie mit Schritt 16 fortfahren. Lassen Sie die Probe auf Raumtemperatur abkühlen, bevor Sie RNase A hinzufügen.
16. Überführen Sie 220 µl des Lysats vorsichtig in Probenröhrchen, die in das Röhrchen-Gestell des QIASymphony SP eingesetzt werden können.

Hinweis: Falls ein Lysat unverdautes Material enthält, zentrifugieren Sie die betreffende Probe bei Raumtemperatur für 2 Minuten bei maximaler Drehzahl, bevor Sie den Überstand in das Probenröhrchen überführen. Eine vollständige Liste der kompatiblen Probenröhrchen finden Sie unter www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Wir empfehlen, 2-ml-Röhrchen (z. B. Kat.-Nr. 72.693 oder 72.608 von Sarstedt) zu benutzen.

Bearbeitungshistorie

Bearbeitungshistorie des Dokuments	
R3 12/2017	Aktualisierung für die QIASymphony Software, Version 5.0

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische rechtliche Hinweise finden Sie im Handbuch oder der Gebrauchsanweisung des jeweiligen QIAGEN® Kits. QIAGEN Kit Handbücher und Gebrauchsanweisungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com, oder sie können vom Technischen Service von QIAGEN oder von Ihrem örtlichen Distributor angefordert werden..

Warenzeichen: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Eingetragene Marken, Warenzeichen usw., die in diesem Dokument verwendet werden, auch wenn sie nicht ausdrücklich als solche gekennzeichnet sind, gelten als gesetzlich geschützt.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/shop | Technische Beratung support.qiagen.com | Internetseite www.qiagen.com