

Февруари 2023 г.

Инструкции за употреба (наръчник) на QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit



Версия 2



За инвитро диагностика

За употреба с QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Каталожен номер



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ГЕРМАНИЯ



1130780BG

Съдържание

Предвидена употреба	4
Потребители, за които е предназначен	4
Описание и принцип	5
Кратко изложение и обяснение	5
Принцип на процедурата	5
Предоставени материали	7
Съдържание на набора	7
Компоненти на набора	8
Необходими, но непредоставени материали	9
Допълнителни реактиви	9
Консумативи	9
Оборудване	9
Предупреждения и предпазни мерки	10
Информация за безопасността	10
Информация при спешни случаи	11
Предпазни мерки	11
Изхвърляне	12
Съхранение и боравене с реактиви	13
Стабилност при употреба	13
Съхранение и работа с проби	14
Процедура	15
Протокол: Изолиране на геномна ДНК от FFPE тъканни срезове	22

Контрол на качеството	26
Ограничения	27
Работни характеристики	28
Ръководство за отстраняване на проблеми	29
Символи	31
Приложение: Работа	34
Информация за поръчка	35
Хронология на редакциите на документа	36

Предвидена употреба

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit представлява система, която използва технология с кварцова мембрана (технология QIAamp) за изолиране и пречистване на геномна ДНК от биологични проби, фиксирани с формалин, вградени в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Той е предназначен за ръчна подготовка на аликвотни части и не дава качествени и количествени резултати от тестове.

Потребители, за които е предназначен

Продуктът е предназначен за употреба от професионални потребители – например лаборанти и лекари, обучени в техниките на молекулярната биология за целите на инвитро диагностиката (In Vitro Diagnostic, IVD).

Описание и принцип

Кратко изложение и обяснение

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit се използва за пречистване на ДНК от FFPE тъканни срези. Той използва утвърдената микротехнология QIAamp DNA Micro за пречистване на геномна и митохондриална ДНК от малки по обем или размер аликвотни части. Наборът съчетава възможностите на кварцова мембрана за избирателно свързване с възможностите за използване на различни обеми.

Условията за лизиране позволяват ефективно пречистване на геномна ДНК от FFPE тъканни срези, без да е необходимо инкубиране през нощта. Инкубирането при повишена температура след разграждането на протеиназа К частично премахва формалиновото omрежване на освободената ДНК, което потенциално подобрява добива, както и ефективността на ДНК при последващите анализи. Имайте предвид, че ДНК, изолирана от FFPE аликвотни части, обикновено е с по-ниско молекулно тегло от ДНК от пресни или замразени аликвотни части. Степента на фрагментация зависи от вида и възрастта на аликвотната част и от условията, използвани за фиксиране.

След лизиране на аликвотната част простата процедура с QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit е подходяща за едновременна обработка на повече от една аликвотна част.

Потребителят носи отговорността да валидира работните характеристики на системата за всички процедури в неговата лаборатория, които не са включени в проучвания на работните характеристики на QIAGEN®, описани в наръчника.

Принцип на процедурата

Процедурата QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit се състои от 6 стъпки (фигура 1):

- Отстраняване на парафина: Парафинът се разтваря в ксилол и се отстранява.
- Лизиране: Аликвотната част се лизира при 56 °C в денатуриращи условия с протеиназа К.

- Нагрыване: Инкубацията при 90 °C обръща омрежването на формалина.
- Свързване: ДНК се свързва с мембраната и замърсителите преминават през нея.
- Промиване: Остатъчните замърсители се отмиват.
- Елуиране: Чиста, концентрирана ДНК се елуира от мембраната.

Процедура на QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

Аликвотна част





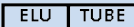
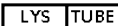







Готова за употреба ДНК

Фигура 1. Процедура на QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Предоставени материали

Съдържание на набора

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	(50)
Каталожен №	60404
Брой подготовки	50

	Идентичност	Символи	Количество
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Колони QIAamp MinElute с епруветки за промиване)		50
WT	Wash Tubes (Епруветки за промиване) (2 mL)		3 × 50
ET	Elution Tubes (Епруветки за елуиране) (1,5 mL)		50
LT	Lysis Tubes (Епруветки за лизиране) (2 mL)		50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Буфер за лизиране на тъкани)		10 mL
AL	Lysis Buffer (Буфер за лизиране)*		12 mL
AW1	Wash Buffer 1 (Промиващ буфер 1)* (концентрат)		19 mL
AW2	Wash Buffer 2 (Промиващ буфер 2)† (концентрат)		13 mL
ATE	Elution Buffer (Буфер за елуиране)†		12 mL
PK	Proteinase K (Протеиназа К)		1,25 mL
–	Инструкции за употреба (наръчник)		1

* Съдържа гуанидинова сол. Не е съвместим с дезинфектанти, съдържащи белина. Вижте страница 10 относно Предупреждения и предпазни мерки.

† Съдържа натриев азид като консервант.

Компоненти на набора

По-долу са обяснени основните компоненти на набора.

Таблица 1. Активни съставки в предоставените реактиви

Реактив		Активни съставки	Концентрация (w/w) [%]
Символ	Име		
ATL	Buffer ATL	Натриев додецил сулфат	≥1 до <10
AL	Buffer AL	Гуанидин хидрохлорид Малеинова киселина	>30 до <50 ≥0,1 до <1
AW1	Buffer AW1	Гуанидин хидрохлорид Етанол	≥50 до <70 ≥10 до <90
AW2	Buffer AW2	Етанол	≥10 до <90
ATE	Buffer ATE	Няма	-
PK	Proteinase K (Протеиназа К)	Протеиназа К	≥1 до <10

За да се сведе до минимум рискът от отрицателно въздействие върху диагностичните резултати, генерирани след изолирането на ДНК, трябва да се използват подходящи контроли за последващите приложения по веригата.

Необходими, но непредоставени материали

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация се обърнете към съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS), предоставени от доставчика на продукта.

Допълнителни реактиви

- Ксилен
- Етанол (96 – 100%)*

Консумативи

- Ако е взето решение да не се използват епруветките, предоставени в набора, препоръчваме микроцентрифужни епруветки от 1,5 mL или 2 mL (за етапите на лизиране) и микроцентрифужни епруветки от 1,5 mL (за етапите на елуиране) (напр., които се предлагат от Sarstedt®, кат. № 72.690). Препоръчваме епруветки без DNase/RNase, с конична форма и надеждно закрепени капаци. Потребителят носи отговорността да валидира работните характеристики на системата за всички процедури в неговата лаборатория, които не са включени в проучвания на работните характеристики на QIAGEN.
- Пипети и крайници за пипети (за избягване на кръстосано замърсяване – силно препоръчваме крайници за пипети с аерозолни бариери)

Оборудване†

- Термомиксер‡, нагреваем орбитален инкубатор, нагревателен блок или водна баня с възможност за инкубация при 56 °C, 70 °C и 90 °C
- Микроцентрифуга† с ротор за 2-mL епруветки
- Вортекс

* Не използвайте денатуриран спирт, който съдържа други вещества като метанол или метилетилкетон.

† Преди употреба се уверете, че апаратите са проверени и калибрани съгласно препоръките на производителя.

‡ За да се гарантира правилната обработка на алиquotните части по процедурите QIAamp DSP DNA FFPE, силно препоръчваме инструментите да са калибрани в съответствие с инструкциите на производителя.

Предупреждения и предпазни мерки

Въз основа на управлението на риска на QIAGEN всички предвидени мерки за контрол на риска са внедрени в дизайна на продукта. Цялостният остатъчен риск е приемлив и употребата на изделието се счита за безопасна. Този наръчник съдържа инструкции, предупреждения и предпазни мерки, за да се гарантират безопасността и работните характеристики на изделието. Те трябва стриктно да се спазват.

Имайте предвид, че може да е необходимо да направите справка с местните разпоредби относно докладване на сериозни инциденти, възникнали във връзка с изделието, на производителя и/или на оторизиран негов представител, и на регулаторния орган в страната по местожителство на потребителя и/или пациента.

Информация за безопасността

При работа с химикали винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Тези листове можете да намерите онлайн в удобен и компактен PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и разпечатате SDS за всеки набор на QIAGEN и компонент на набора.

ВНИМАНИЕ



НЕ наливайте белина или киселинни разтвори директно в отпадъците от подготовката на аликвотните части.

- Buffer AL и Buffer AW1 съдържат гуанидин хидрохлорид, който може да образува силно реактивни съединения с белината.
- Ако се разлее течност, съдържаща такива буфери, я почистете с подходящ лабораторен почистващ препарат и вода. Ако разлятата течност съдържа потенциално инфекциозни агенти, първо почистете замърсената област с лабораторен почистващ препарат и вода, а след това с 1% (по обем) натриев хипохлорит.

- Пробите и аликвотните части са потенциално заразни. Изхвърлете аликвотната част и отпадъка от анализа в съответствие с местните процедури за безопасност.

Информация при спешни случаи

CHEMTREC

САЩ и Канада 1-800-424-9300

Извън САЩ и Канада +1 703-527-3887

Предпазни мерки

Buffer AL



Съдържа: гуанидин хидрохлорид и малеинова киселина. Предупреждение! Може да бъде вреден при поглъщане или вдишване. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Може да предизвика алергична реакция на кожата. Ако дразненето на очите продължава: потърсете медицинска помощ. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължете с изплакването. Съблечете замърсените дрехи и ги изперете, преди да се използват отново. ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода. При дразнене на кожата: потърсете медицинска помощ. Да се използват предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Buffer ATL



Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. При дразнене на кожата: потърсете медицинска помощ.

Buffer AW1



Съдържа: гуанидин хидрохлорид. Предупреждение! Вреден при поглъщане или вдишване. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар, ако почувствате неразположение. Депонирайте съдържанието/съда в одобрено съоръжение за депониране на отпадъци. Съблечете замърсените дрехи и ги изперете, преди да се използват отново. Да се използват предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Proteinase K



Съдържа: Протеиназа К. Опасно! Предизвиква леко дразнене на кожата. При вдишване може да предизвика алергия, симптоми на астма или затруднено дишане. Избягвайте вдишване на прах/дим/газ/мъгла/пари/пръски. Депонирайте съдържанието/съда в одобрено съоръжение за депониране на отпадъци. При поява на респираторни симптоми: Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ/на лекар. ПРИ ВДИШВАНЕ: Ако дишането е затруднено, изведете пострадалото лице на чист въздух и го оставете в покой, в удобно за дишане положение. Носете дихателна защита.

Изхвърляне

Отпадъците съдържат аликвотни части и реактиви. Тези отпадъци може да съдържат токсичен или инфекциозен материал и трябва да се изхвърлят по подходящ начин. Вижте местните разпоредби за безопасност относно правилните процедури за изхвърляне.

За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Те са достъпни онлайн в PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате информационния лист за безопасност (Safety Data Sheet, SDS) за всеки набор QIAGEN и неговите компоненти.

Съхранение и боравене с реактиви

Колоните QIAamp MinElute трябва да се съхраняват при 2 – 8 °C след пристигането им и могат да се използват до датата на изтичане на срока на годност, посочена върху кутията на набора.

Всички буфери могат да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °C) и са стабилни до датата на изтичане на срока на годност на набора, ако не са отваряни.

Стабилност при употреба

Разтворените Buffer AW1 и AW2 могат да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °C) до 1 година или до датата на изтичане на срока на годност на набора, в зависимост от това кой период е по-кратък.

Съхранение и работа с проби

Наборът QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit е разработен за употреба с проби, фиксирани във формалин и вградени в парафин (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Стабилността на ДНК зависи от различни фактори като вземането, боравенето, подготовката и условията на съхранение на пробите, което може да повлияе на употребата ѝ в приложението надолу по веригата. Важно е да направите справка с инструкциите за употреба на конкретното приложение надолу по веригата и/или да проверите и валидирате целия работен процес, за да установите подходящи условия.

За обща информация относно лабораторните процедури за вземане, боравене, подготовка и условия на съхранение на проби от FFPE вижте ISO 20166-3:2018 „Молекулярно изследване за инвитро диагностика — Спецификации за предварителни аналитични процеси за фиксирана във формалин и поставена в парафин (FFPE) тъкан — част 3: Изолиране на ДНК“ и MM13-A на CLSI „Вземане, транспортиране, подготовка и съхранение на проби за молекулярни методи; Одобрена насока“.

ДНК се елуира в Buffer ATE и е готова за употреба в реакции на амплификация или за съхранение (условията зависят от изискванията на потребителя). За препоръчителните условия на съхранение за конкретни приложения на QIAGEN надолу по веригата вижте съответните наръчници за наборите.

Процедура

Важни моменти преди започване

- Всички реактиви, доставени с набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, са предназначени да бъдат използвани единствено с останалите реактиви в същия набор QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit. Не трябва да се правят замествания на реактивите в набора, ако трябва да се поддържат оптималните работни показатели.
- След получаването на набора проверете неговите компоненти за увреждания. Ако опаковките или шишетата с буфер са увредени, се обърнете към „Техническо обслужване“ или местния дистрибутор на QIAGEN. В случай на разливане на течност направете справка със „Предупреждения и предпазни мерки“, страница 10. Не използвайте повредени компоненти на набора, тъй като тяхната употреба може да доведе до влошени работни характеристики на набора.
- Не използвайте компоненти от други набори с набора, който използвате в момента, освен ако номерата на партидите не са идентични.
- Не допускайте микробиологично замърсяване на реактивите на набора.
- Този набор трябва да се използва само от персонал със съответното обучение по лабораторната практика за инвитро диагностика.
- Винаги носете латексови или винилови ръкавици, когато работите с реактиви и аликвотни части, за да предотвратите замърсяване от повърхността на кожата или от прашно лабораторно оборудване. Бактерии и плесени може да има по ръцете и праховите частици и затова те са чести източници на замърсяване. Сменяйте често ръкавиците и дръжте епруветките затворени.
- Неизползваните буфери, промивки и остатъци от аликвотни части трябва да се изхвърлят в съответствие с местните процедури.

- Ако използвате собствена пластмасова посуда, по време на процедурата за пречистване се препоръчва използването на полипропиленови конични епруветки за еднократна употреба с обем 1,5 – 2 mL, без DNase/RNase, със слабо свързване и надеждно закрепени капаци.
- Извършвайте всички етапи на центрофугиране при стайна температура (15 – 25 °C).
- Всички буфери трябва да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °C) и да се разбъркат добре преди употреба.
- Настройте термомиксера или отопляемия орбитален инкубатор на 56 °C за употреба в стъпка 9. Ако не разполагате с термомиксер или отопляем орбитален инкубатор, вместо него може да се използва нагревателен блок или водна баня.
- Ако Buffer AL или Buffer ATL съдържа утайки, разтворете ги чрез нагряване до 70 °C с леко разбъркване.
- Уверете се, че Buffer AW1 и Buffer AW2 са приготвени в съответствие с инструкциите по-долу.
- Процедурите за контрол на качеството в QIAGEN включват функционално тестване на пускането на набора за всяка отделна партида набори. Затова не смесвайте реактиви от различни партиди набори и не комбинирайте отделни реактиви от различни партиди на реактиви.

Подготовка на буфери

Подготовка на Buffer ATL

- Преди да започнете процедурата, проверете дали не се е образувал преципитат в Buffer ATL. Ако е необходимо, го разтворете с нагряване до 70 °C с леко разбъркване.

Подготовка на Buffer AL

- Преди да започнете процедурата, проверете дали в Buffer AL се е образувала утайка. Ако е необходимо, го разтворете с нагряване до 70 °C с леко разбъркване.

Подготовка на Buffer AW1

- Добавете 25 mL етанол (96 – 100%)* към бутилката, съдържаща 19 mL концентриран Buffer AW1. Поставете отметка на етикета на шишето, за да отбележите, че е прибавен етанол. Разтвореният Buffer AW1 може да се съхранява при стайна температура (15 – 25 °C) в продължение на до 1 година или до изтичане на срока на годност на набора, в зависимост от това кой период е по-кратък. Препоръчваме да напишете датата на разтваряне върху етикета на буфера.

Забележка: Преди да започнете процедурата, разбъркайте разтворения Buffer AW1 чрез разклащане.

Подготовка на Buffer AW2

- Добавете 30 mL етанол (96 – 100%)* към бутилката, съдържаща 13 mL концентриран Buffer AW2. Поставете отметка на етикета на шишето, за да отбележите, че е прибавен етанол. Разтвореният Buffer AW2 може да бъде съхраняван при стайна температура (15 – 25 °C) в продължение на до 1 година или до изтичане на срока на годност, в зависимост от това кой период е по-кратък. Препоръчваме да напишете датата на разтваряне върху етикета на буфера.

Забележка: Преди да започнете процедурата, разбъркайте разтворения Buffer AW2 чрез разклащане.

Изходен материал

Изходният материал за пречистване на ДНК са FFPE тъканни срези (в идеалния случай прясно изрязани). Няколко среза могат да се комбинират в 1 препарат. Ако нямате информация за естеството на изходния материал, препоръчваме да започнете с не повече от 3 секции за един препарат.

* Не използвайте денатуриран спирт, който съдържа други вещества като метанол или метилетилкетон.

Потребителят трябва да оптимизира броя на срезите, дебелината на срезите и площта на срезите за всички процедури, използвани в лабораторията. Ако наборът се използва във връзка с приложение на QIAGEN надолу по веригата, вижте инструкциите в съответния наръчник.

Процедура за работа, за да се избегне кръстосано замърсяване

Поради чувствителността на технологиите за амплификация на нуклеинови киселини трябва да се вземат следните предпазни мерки, когато се работи с колони QIAamp MinElute, за да се предотврати кръстосано замърсяване между различните аликвотни части:

- Не препълвайте епруветките с тъкан.
- Сменяйте скалпелите между аликвотните части, когато остъргвате тъканта.
- Накапвайте внимателно аликвотната част или разтвора в колоната QIAamp MinElute. Пипетиране на аликвотната част в колоната QIAamp MinElute, без да мокрите ръба на колоната.
- Задължително сменяйте накрайниците на пипетите при всяко прехвърляне на течност. Препоръчваме да използвате накрайници за пипети с аерозолна бариера.
- Винаги използвайте нови епруветки за промиване, когато извършвате стъпки за промиване на аликвотните части.
- Уверете се, че капачките на епруветките са напълно затворени, преди да ги разбъркате и центрофугирате.
- Уверете се, че колоната QIAamp MinElute е напълно затворена преди центрофугиране.
- След всички стъпки за импулсно разбъркване на вортекса и инкубационните стъпки при 90 °C центрофугирайте кратко време всички епруветки в микроцентрофугата, за да изчистите капките от вътрешната част на капачиците.
- Не отваряйте повече от 1 колона QIAamp MinElute едновременно и внимавайте, за да предотвратите отделяне на аерозоли.
- Винаги сменяйте скалпелите между аликвотните части.

- Задължително сменяйте накрайниците на пипетите при всяко прехвърляне на течност. За свеждане на кръстосаното замърсяване до минимум препоръчваме използване на накрайници за пипети с аерозолна бариера и избягване употребата на многостепенни пипети.
- Винаги използвайте ръкавици за еднократна употреба и редовно проверявайте дали те не са замърсени с материал от алиquotната част. Изхвърлете ръкавиците, ако подозирате, че са замърсени.
- Не отваряйте повече от 1 епруветка едновременно.

Центрофугиране

Колоните QIAamp MinElute се побират в повечето стандартни микроцентрифужни епруветки от 1,5 – 2 mL. Колоните QIAamp MinElute се центрофугират на около 6000 × *g*, за да се намали шумът от центрофугата. Центрофугирането с пълна скорост няма да подобри добива на ДНК. Въпреки това центрофугирането на колоните QIAamp MinElute на пълна скорост е необходимо в 2 етапа от процедурата: етапа на сухото центрофугиране след промиване на мембраните и етапа на елуиране. Центрофугиране на пълна скорост се изисква и за сваляне на алиquotната част след обработката с ксилол и етаноловото промиване.

Всички стъпки за центрофугиране трябва да се извършват при стайна температура (15 – 25 °C). Ниската температура на центрофугиране може да доведе до неоптимална екстракция.

Обработка на колони QIAamp MinElute в микроцентрифуга

- Винаги затваряйте колоните QIAamp MinElute, преди да ги поставите в микроцентрифугата.
- Не допускайте докосване на мембраната на колоната QIAamp MinElute с накрайника на пипетата.
- Остатъчните фракции може да съдържат опасни отпадъци и затова трябва да се депонират по съответния начин.
- За ефикасна паралелна обработка на повече от една аликвотна част препоръчваме да се зареди статив с епруветки за промиване, в който да се прехвърлят колоните QIAamp MinElute след центрофугирането. Използваните епруветки за промиване с остатъците може да се изхвърлят и новите епруветки за промиване с колоните QIAamp MinElute може да се поставят направо в микроцентрифугата.
- Уверете се, че по време на целия процес се поддържа пълна проследимост на аликвотната част.

Елуиране на пречистена ДНК

За приложения надолу по веригата, които изискват малки начални обеми (напр. някои PCR анализи), по-концентрираният елуат може да увеличи чувствителността на анализа, но може да доведе и до увеличаване на концентрацията на потенциални инхибитори.

Увеличаването на обема за елуиране обаче ще намали концентрацията на ДНК в елуата.

Обемът на възстановения елуат може да бъде приблизително с 5 μL по-малък от обема на Buffer ATE, нанесен върху колоната QIAamp MinElute. Например при обем на елуиране от 20 μL се получава $\geq 15 \mu\text{L}$ елуат. Извлеченият обем на елуата зависи от характеристиките на аликвотната част.

Потребителят е отговорен за оптимизирането на обема на елуиране за всички процедури, използвани в неговата лаборатория. Направете справка с наръчниците на наборите за препоръчителните обеми на елуиране, необходими за специфични приложения на QIAGEN надолу по веригата.

Добивът може да се увеличи, ако колоната се инкубира с Buffer ATE при стайна температура за, например, 5 минути преди центрофугиране. Елуираната ДНК може да се събира в епруветките за елуиране с обем 1,5 mL (предоставени). Условието за съхранение на елуираната ДНК зависят от изискванията, определени от потребителя. Направете справка в наръчниците на наборите за препоръчителните условия на съхранение за специфични приложения на QIAGEN надолу по веригата.

Протокол: Изолиране на геномна ДНК от FFPE тъканни срезове

Процедура

1. С помощта на скалпел отрежете излишния парафин от блока с аликутни части.
2. Изрежете срезите, като следвате стандартната лабораторна практика (вж. „Изходен материал“, стр. 17). Потребителят трябва да оптимизира броя на срезите, дебелината на срезите и площта на срезите за всички процедури, използвани в лабораторията. Уверете се, че проследимостта на аликутните части е запазена по време на цялата процедура.
3. Незабавно изстържете тъканта от разрезите с помощта на стерилен скалпел в епруветка за лизиране (предоставена). Уверете се, че цялата налична тъкан е поставена в епруветката. Добавете 1 mL ксилол към аликутната част, затворете капака и извършете енергично вихрово разбъркване, докато парафинът се разтвори (напр. 10 секунди). Уверете се, че епруветката е напълно затворена, за да се избегне разливане на ксилол, кръстосано замърсяване между аликутни части и възможен контакт с ксилола.

Забележка: Използвайте ксилол в аспиратори или други подходящи уреди за изолиране.

4. Центрофугирайте с пълна скорост за около 2 минути при стайна температура, за да съберете тъканната утайка. Ако не се образува тъканна утайка, повторете тази стъпка.

Забележка: Ниската температура на центрофугиране може да доведе до неоптимална екстракция.

5. Отстранете и изхвърлете супернатанта чрез пипетиране. Запазете утайката. Супернатантата съдържа ксилол, който е опасен отпадък и трябва да се изхвърли по подходящ начин, съгласно местните разпоредби.
6. Добавете 1 mL етанол (96 – 100%) към тъканната утайка и извършете щателно вихрово разбъркване.

Етанолът извлича остатъчния ксилол от аликвотната част и трябва да се изхвърли по подходящ начин.

7. Центрофугирайте при пълна скорост в продължение на приблизително 2 минути при стайна температура.

Внимателно отстранете супернатантата чрез пипетиране. Не отстранявайте нито една от утайките.

Внимателно отстранете остатъчния етанол с фин накрайник за пипети. Отворете епруветката и инкубирайте при 15 – 40 °С, докато се изпари целият остатъчен етанол. Отстраняването на остатъчния етанол е от решаващо значение за успеха на екстракцията.

Забележка: По-ниската температура на инкубация забавя времето на изпаряване, докато по-високата температура може да доведе до пресушаване на утайката, което затруднява суспендирането ѝ.

8. Отново суспендирайте утайката в 180 µL Buffer ATL. Добавете 20 µL протеиназа K и извършете вихрово разбъркване.

Забележка: Утайката трябва да се ресуспендира добре в ATL буфера, за да се осигури максимално възстановяване на добива.

9. Инкубирайте при 56 °С в продължение на приблизително 1 час (или докато аликвотната част бъде напълно лизирана).

10. Инкубирайте при 90° С в продължение на 1 час.

Инкубирането при 90 °С в Buffer ATL частично обръща формалдехидната модификация на нуклеиновите киселини. По-краткото време на инкубация или по-ниската температура на инкубация могат да повлияят на качеството и количеството на ДНК. При използване на само 1 нагревателен блок, след инкубиране при 56 °С, оставете аликвотната част на стайна температура, докато нагревателният блок не достигне 90 °С.

11. Центрофугирайте кратко време епруветката, за да изчистите капките от вътрешната част на капака.

12. Добавете 200 μL Buffer AL към аликвотната част и разбъркайте добре чрез вихрово разбъркване. След това добавете 200 μL етанол (96 – 100%) и отново разбъркайте добре чрез вортекс.

От съществено значение е аликвотната част, Buffer AL и етанолът да се смесят незабавно и щателно чрез вихрово разбъркване или пипетиране, за да се получи хомогенен разтвор. Buffer AL и етанолът могат да се смесят предварително и да се добавят заедно в 1 стъпка, за да се спести време при обработката на множество аликвотни части. При добавянето на Buffer AL и етанол може да се образува бяла утайка. Тази утайка не пречи на процедурата QIAamp. Винаги използвайте прясна смес и я изхвърляйте веднага след употреба.

13. Центрофугирайте кратко време епруветката, за да изчистите капките от вътрешната част на капака.
14. Внимателно прехвърлете целия лизат в колоната QIAamp MinElute (в епруветка за промиване с обем 2 mL), без да навлажнявате ръба, затворете капака и центрофугирайте при $6000 \times g$ за ≥ 1 минута. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста промивна епруветка от 2 mL (предоставена) и изхвърлете промивната епруветка, съдържаща остатъка.

Ако лизатът не е преминал изцяло през мембраната след центрофугирането, центрофугирайте отново на по-високи обороти, докато колоната QIAamp MinElute се изпразни.

15. Внимателно отворете колоната QIAamp MinElute и прибавете 500 μL разтворен Buffer AW1, без да мокрите ръба. Затворете капака и центрофугирайте при $6000 \times g$ за ≥ 1 минута. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста 2-mL епруветка за промиване и изхвърлете епруветката за промиване с остатъка.
16. Внимателно отворете колоната QIAamp MinElute и прибавете 500 μL разтворен Buffer AW2, без да мокрите ръба. Затворете капака и центрофугирайте при $6000 \times g$ за ≥ 1 минута. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста 2-mL епруветка за промиване и изхвърлете епруветката за промиване с остатъка.

Трябва да се избягва контакт между колоната QIAamp MinElute и остатъка. Не забравяйте да балансирате ротора на центрофугата. Някои ротори на центрофуги може да вибрират при забавянето на оборотите, в резултат на което остатъкът с етанол може да влезе в контакт с колоната QIAamp MinElute. Внимавайте при изваждането на колоната QIAamp MinElute и епруветката за промиване от ротора, за да не влезе остатъкът в контакт с колоната QIAamp MinElute.

17. Центрофугирайте на пълни обороти (около 20 000 × g) в продължение на приблизително 3 минути, за да изсушите мембраната.

Пренасяне на етанол в елуата може да повлияе на някои приложения надолу по веригата.

18. Поставете колоната QIAamp MinElute в чиста 1,5-mL епруветка за елуиране (предоставена) и изхвърлете епруветката за промиване, съдържаща остатък. Внимателно отворете капака на колоната QIAamp MinElute и накапете 20 – 200 µL Buffer ATE в центъра на мембраната.

Важно: Ако използвате малки елуиращи обеми (<50 µL), дозирайте Buffer ATE в центъра на мембраната, за да осигурите пълно елуиране на свързаната ДНК. Колоните QIAamp MinElute осигуряват гъвкавост при избора на обем на елуиране. Изберете обем в съответствие с изискванията на приложението надолу по веригата. Обемът на елуата ще бъде с около 5 µL по-малък от обема на разтвора за елуиране, накапан в колоната.

19. Затворете капака и инкубирайте при стайна температура (15 – 25° C) за най-малко 1 минута. Центрофугирайте на максимална скорост (приблизително 20 000 × g) за ≥ 1 минута.

Инкубирането на колоната QIAamp MinElute, заредена с Buffer ATE, за около 5 минути при стайна температура преди центрофугиране може да увеличи добива на ДНК.

Контрол на качеството

В съответствие със сертифицираната по ISO Система за управление на качеството на QIAGEN всяка производствена партида QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit се тества по предварително определени спецификации, за да се осигури постоянно качество на продуктите.

Ограничения

Ефективността на набора е установена при използване на FFPE тъкани за изолиране на геномна ДНК.

Недостатъчното или прекомерното фиксиране може да повлияе на качеството на ДНК, което ще влоши резултатите при последващите анализи.

Остатъчният формалин може да потисне стъпката за разграждане с протеиназа К; уверете се, че аликвотните части са напълно дехидратирани преди вграждане.

Потребителят носи отговорност за валидиране на характеристиките на системата при процедури, използвани в лабораторията, които не се обхващат от изпитванията на QIAGEN.

За да се сведе до минимум рискът от отрицателно въздействие върху диагностичните резултати, трябва да се използват подходящи контроли за последващите приложения по веригата. За допълнително валидиране се препоръчва да се използват указанията на International Conference on Harmonisation of Technical Requirements (Международната конференция за хармонизиране на техническите изисквания) (ICH) в ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Валидиране на аналитични процедури: текст и методика).

Всички получени диагностични резултати трябва да се интерпретират заедно с другите клинични или лабораторни констатации.

При използване на набора QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit РНК може да бъде съпребриствена с ДНК, ако присъства в аликвотната част.

Работни характеристики

Приложимите работни характеристики могат да бъдат намерени в раздела Resources (Ресурси) на страницата с продукти на www.qiagen.com.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте и страницата „Често задавани въпроси“ (Frequently Asked Questions, FAQ) в нашия Център за техническа поддръжка: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Учените в „Технически услуги“ на QIAGEN винаги с радост ще отговорят на всички Ваши въпроси относно информацията и/или протоколите в този наръчник или относно аликвотните части и технологиите на анализ (за информация за контакти посетете www.qiagen.com).

Коментари и предложения

Запушени колонии QIAamp MinElute

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Твърде много изходен материал | Намалете количеството изходен материал. От съществено значение е да използвате правилното количество изходен материал (вижте страница 17). |
| b) | Температурата на центрофугиране е твърде ниска | Температурата на центрофугиране трябва да е 15 – 25 °C. Някои центрофуги могат да се охладят до под 15 °C дори когато са настроени на 20 °C. Това може да доведе до образуване на утайки, които може да запушат колоните QIAamp MinElute. Ако това се случи, настройте температурата на центрофугиране на 15–25 °C. |

Нисък добив на ДНК

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Твърде много изходен материал | Претоварването на центрофугиращите колонии QIAamp MinElute значително намалява добива на нуклеинова киселина. Намалете количеството изходен материал (вижте страница 17). |
| b) | ДНК все още е свързана към мембраната на центрофугиращата колона RNeasy MinElute | Повторете елуирането на ДНК, но инкубирайте центрофугиращата колона QIAamp MinElute върху плота за 10 минути с Buffer ATE (елуиращ буфер) преди центрофугиране. |
| c) | Неправилно съхранение на буфери/реактиви | QIAamp MinElute Spin Columns трябва да се съхраняват при 2 – 8 °C след пристигането на набора. Проверете дали температурата на съхранение е правилна, тъй като излагането на по-високи температури за по-дълги периоди от време може да доведе до нарушаване на функционалността. |

Ниска стойност на A_{260}/A_{280}

Използвана е вода за разреждане на нуклеинова киселина за измерването на A_{260}/A_{280}

За разреждането на аликвотната част преди измерване на чистотата трябва да използвате 10 mM Tris Cl, pH 7,5, а не вода.











ДНК не се представя добре в анализи/приложения надолу по веригата

Пренасяне на етанол

В 2 стъпки от процедурата се изисква центрофугиране на колони QIAamp MinElute на пълни обороти: По време на второто промиване с Buffer AW2 трябва да центрофугирате при $\geq 8000 \times g$ за 2 минути при 15 – 25 °C, за да изсушите мембраната на центрофугиращата колона QIAamp MinElute. След центрофугиране внимателно отстранете колоната от епруветката за вземане, така че колоната да не влиза в контакт с остатъка. След това поставете колоната в нова епруветка за взимане и центрофугирайте на пълни обороти за 5 минути. Центрофугирането на пълни обороти се изисква и за сваляне на аликвотната част след обработката с ксилол и етаноловото промиване.

Символи

Следните символи фигурират в инструкциите за употреба или на опаковката и етикетите:

Символ	Описание на символа
	Съдържа достатъчно реактиви за <N> реакции
	Използвайте до
	Този продукт отговаря на изискванията на Европейски регламент 2017/746 за медицински изделия за инвитро диагностика.
	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	Каталожен номер
	Партиден номер
	Номер на материала (т.е. етикет на компонента)
	Компоненти
	Съдържа
	Номер

Символ	Описание на символа
	Глобален номер на търговска единица
Rn	„R“ означава редакция на Инструкциите за употреба, а „n“ е номерът на редакцията
	Температурни ограничения
	Производител
	Направете справка с инструкциите за употреба
	Пазете от слънчева светлина
	Предупреждение/внимание
	Протеиназа К
	Натриев азид
	След получаване
	Запишете днешната дата след прибавянето на етанол в шишето

Символ	Описание на символа
EtOH	Етанол
ADD	Добавяне
GuHCl	Гуанидин хидрохлорид
MALEIC ACID	Малеинова киселина
UDI	Уникален идентификатор на изделието

Приложение: Работа

Обща работа

Винаги носете латексови или винилови ръкавици, когато работите с реактиви и аликвотни части, за да предотвратите замърсяване от повърхността на кожата или от прашно лабораторно оборудване. Бактерии и плесени може да има по ръцете и праховите частици и затова те са чести източници на замърсяване. Сменяйте често ръкавиците и дръжте епруветките затворени. Не допускайте микробиологично замърсяване на реактивите на набора.

Пластмасови изделия за еднократна употреба

По време на процедурата се препоръчва да се използват стерилни полипропиленови епруветки за еднократна употреба.

Информация за поръчка

Продукт	Съдържание	Кат. №
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit — за пречистване на геномна ДНК от тъкани, вградени в парафин		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	За 50 подготовки за ДНК: 50 колони QIAamp MinElute, протеиназа К, буфери, епруветки за промиване (2 mL), епруветки за елуиране (1,5 mL), епруветки за лизиране (2 mL)	60404

За актуална лицензионна информация и заявления за освобождаване от отговорност за конкретни продукти вижте инструкциите за употреба на съответния набор QIAGEN. Ръководствата за употреба на набора QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за технически услуги на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Хронология на редакциите на документа

Редакция	Описание
R1, юни 2022 г.	<ul style="list-style-type: none">● Актуализация до версия 2 на набора за съответствие с IVDR● Актуализиран е разделът Описание и принцип● Актуализиран е разделът Необходими, но непредоставени материали● Актуализиран е разделът Предупреждения и предпазни мерки● Актуализиран е разделът Съхранение и боравене с реактиви● Актуализиран е разделът Ръководство за отстраняване на проблеми● Актуализирано е Приложение
R2, февруари 2023 г.	<ul style="list-style-type: none">● Актуализация на раздел „Съхранение и работа с проби“

Ограничено лицензно споразумение за QIAamp DSP DNA Kit

Употребата на този продукт означава, че всеки купувач или потребител на продукта приема следните условия:

1. Продуктът може да се използва само по протоколите, предоставени с продукта и този наръчник, и само с компонентите, съдържащи се в набора. QIAGEN не предоставя лиценз по никакви права върху своята интелектуална собственост за употребата или включването на приложените компоненти на този набор с компоненти, които не са включени в този набор, освен както е описано в протоколите, предоставени с продукта, този наръчник и допълнителните протоколи, които могат да се изтеглят от адрес www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са тествани щателно или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
2. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
3. Този набор и неговите компоненти се лицензират за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, обновяват или препродават.
4. QIAGEN изрично се освобождава от всички други лицензи, изрични или подразбиращи се, с изключение на изрично заявените.
5. Купувачът и потребителят на набора се съгласяват да не предприемат и да не позволяват на други лица да предприемат стъпки, които могат да улеснят или да доведат до някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разноски, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

Актуалните условия на лиценза ще намерите на www.qiagen.com.

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

Фев-2023 НВ-3033-002 1130780BG © 2023 QIAGEN, всички права запазени.

Поръчки: www.qiagen.com/shop | Техническа поддръжка: support.qiagen.com |
Уебсайт: www.qiagen.com