

Vasaris, 2017

„QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadovas



1 versija

IVD

Skirtas in vitro diagnostikai

CE

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
VOKIETIJA

R3 **MAT**

1062689LT



Turinys

Numatytoji paskirtis	5
Santrauka ir paaiškinimas	5
Procedūros principas	6
Pateiktos medžiagos	8
Rinkinio turinys	8
Būtinės, bet nepateiktos medžiagos	9
Įspėjimai ir atsargumo priemonės	10
Reagentų laikymas ir naudojimas	11
Mėginių naudojimas ir laikymas	12
Procedūra	13
Buferinių tirpalų ruošimas	14
Pradinė medžiaga	15
Darbinės procedūros siekiant išvengti kryžminės taršos	16
Centrifugavimas	17
„QIAamp MinElute“ kolonėlių apdorojimas mikrocentrifugoje	17
Išgrynintos DNR eliuavimas	18
Protokolas: Genominės DNR izoliavimas iš FFPE audinio pjūvių	19
Kokybės kontrolė	23
Apribojimai	23
Veikimo charakteristikos	24
Simboliai	24
Kontaktinė informacija	25
Užsakymo informacija	26

Numatytoji paskirtis

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinys yra sistema, kurioje iš formaline fiksuotų ir parafine įlietų (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) biologinių mėginių gaunamai genominei DNR izoliuoti ir gryninti naudojama silicio membranos technologija („QIAamp“ technologija).

Šis gaminys skirtas profesionaliems naudotojams, pvz., technikams ir gydytojams, kurie yra susipažinę su molekulinės biologijos technologijomis, skirtomis in vitro diagnostikai (IVD). Jis skirtas mėginiams ruošti rankiniu būdu, juo nėra įmanoma gauti jokių kokybinių ar kiekybinių rezultatų.

Santrauka ir paaiškinimas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinys naudojamas iš FFPE audinio pjūvių gautai DNR gryninti. Genominei ir mitochondrinei DNR gryninti esant nedidelio tūrio ar apimties mėginiams naudojama veiksminga „QIAamp DNA Micro“ technologija. Rinkinys pasižymi silicio dioksido membranos selektyvaus prijungimo savybėmis ir eliuavimo tūriu, kurį galima keisti.

Lizės sąlygos leidžia genominei DNR efektyviai išgryninti iš FFPE audinio pjūvių neinkubuojant jų per naktį. Inkubavimas aukštesnėje temperatūroje po to, kai naudojant proteinazę K buvo iš dalies pašalinti išskirtos DNR skersiniai formalino ryšiai, potencialiai pagerina išėigą ir DNR veiksmingumą atliekant tolesnius tyrimus. Atkreipkite dėmesį, kad iš FFPE mėginių izoliuota DNR pasižymi mažesniu molekulinio svoriu nei DNR iš šviežių arba užšaldytų mėginių. Fragmentacijos laipsnis priklauso nuo mėginio tipo ir amžiaus bei fiksavimo metu buvusių sąlygų.

Atlikus mėginių lizę, norint vienu metu apdoroti kelis mėginius galima naudoti paprastą „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ procedūrą.

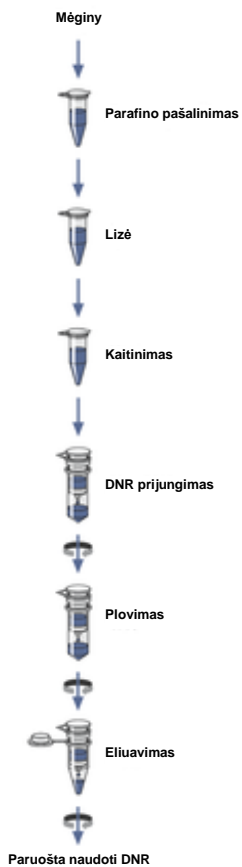
Naudotojas atsako už sistemos efektyvumo užtikrinimą, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima šiame vadove aprašyti QIAGEN efektyvumo tyrimai.

Procedūros principas

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ procedūrą sudaro šeši žingsniai (1 pav.):

- Parafino pašalinimas: Parafinas ištirpdomas ksilene ir pašalinamas
- Lizė: 56 °C temperatūroje, naudojant proteinazę K, denatūracijos sąlygomis vykdoma mėginio lizė
- Kaitinimas: Inkubuojant 90 °C temperatūroje nutraukiami formalino kryžminiai ryšiai
- Prijungimas: DNR prisijungia prie membranos, o teršalai lieka neprisijungę
- Plovimas: Išplaunami likę teršalai
- Eliuavimas: Atliekamas grynos koncentruotos DNR eliuavimas iš membranos

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



1 pav.. „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ procedūra.

Pateiktos medžiagos

Rinkinio turinys

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Katalogo Nr.			60404
Reakcijų skaičius			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes („QIAamp MinElute“ kolonėlės su plovimo mėgintuvėliais)	COL	50
WT	Wash Tubes (2 ml) (Plovimo mėgintuvėliai (2 ml))	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (1.5 ml) (Eliuavimo mėgintuvėliai (1,5 ml))	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (2 ml) (Lizės mėgintuvėliai (2 ml))	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Audinių lizės buferinis tirpalas)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (Lizės buferinis tirpalas*)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (1 plovimo buferinis tirpalas* (koncentratas))	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (concentrate) (2 plovimo buferinis tirpalas† (koncentratas))	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer† (Eliuavimo buferinis tirpalas†)	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (Proteinazė K)	PROTK	1,25 ml
–	Instructions For Use (Handbook) (Naudojimo instrukcijos (vadovas))	HB	1

* Sudėtyje yra guanidino druskos. Nesuderinama su dezinfekantais, kurių sudėtyje yra baliklio. Informacijos apie įspėjimus ir atsargumo priemones žr. 10 psl.

† Sudėtyje yra konservanto natrio azido.

Būtinios, bet nepateiktos medžiagos

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos yra atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDL), kuriuos gali pateikti gaminio tiekėjas.

Reagentai

- Ksilenas
- Etanolis (96–100 %)*

Reikmenys

- Priėmus sprendimą nenaudoti su rinkiniu pateiktų mėgintuvėlių, mes rekomenduojame naudoti 1,5 ml arba 2 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlius (lizės žingsniams) ir 1,5 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlius (eliuavimo žingsniams) (juos galima įsigyti iš „Eppendorf®“ [„Safe-Lock“: kat. nr. 022363204, JAV; kat. nr. 0030 120.086, Europa] arba „Sarstedt“ [kat. nr. 72.690]). Rekomenduojame naudoti kūgio formos mėgintuvėlius be DNazės/RNazės su saugiais dangteliais.
- Pipetės ir pipečių antgaliai (siekiant išvengti kryžminės taršos, rekomenduojame naudoti pipečių antgalius su aeroliniais barjeriais)

Įranga

- „ThermoMixer“[†], kaitinamas orbitinis inkubatorius, kaitinimo blokas arba vandens vonelė, galinti inkubuoti esant 56 °C, 70 °C ir 90 °C temperatūrai
- Mikrocentrifuga[†] su rotoriumi 2 ml mėgintuvėliams
- Purtytuvas

* Nenaudokite denatūruoto alkoholio, kuriame yra kitų medžiagų, pvz., metanolio ar metiletilketono.

[†] Siekiant užtikrinti, kad mėginiai būtų tinkamai apdorojami „QIAamp DSP DNA FFPE“ procedūrų metu, mes primygtinai rekomenduojame sukalibruoti instrumentus laikantis gamintojo rekomendacijų.

Įspėjimai ir atsargumo priemonės

Skirtas in vitro diagnostikai

Dirbdami su chemikalais, visada dėvėkite tinkamą laboratorinį chalata, mūvėkite vienkartinės pirštines ir naudokite apsauginius akinius. Daugiau informacijos rasite atitinkamuose saugos duomenų lapuose (SDL). Juos patogiu ir kompaktišku PDF formatu rasite interneto svetainėje www.qiagen.com/safety, čia galite rasti, perskaityti ir išspausdinti kiekvieno QIAGEN® rinkinio ir rinkinio komponento SDL.



ĮSPĖJIMAS: NEPILKITE baliklio ar rūgštinių tirpalų tiesiai į mėginių ruošimo atliekas.

AL buferiniame tirpale ir AW1 buferiniame tirpale yra guanidino hidrochlorido, kuriam jungiantis su balikliu gali sudaryti intensyviai reaguojančių mišinių.

Išsiliejus skysčiui, kuriame yra šių buferinių tirpalų, valydami naudokite tinkamą laboratorinį ploviklį ir vandenį. Jei išsiliejusiame skystyje yra potencialiai užkrečiamų medžiagų, atitinkamą vietą iš pradžių nuvalykite laboratoriniu plovikliu ir vandeniu, o tada 1% (v/v) natrio hipochloritu.

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinio komponentams taikomos toliau nurodytos pavojingumo ir atsargumo frazės.

Buferinis tirpalas AL



Sudėtyje yra: huanidino hidrochlorido, maleino rūgšties. Atsargiai! Gali būti kenksminga prarijus arba įkvėpus. Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Gali sukelti alerginę odos reakciją. Jei akių dirginimas nepraeina: kreiptis į gydytoją. **PATEKUS Į AKIS:** Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. **PATEKUS ANT ODOS:** Nuplauti dideliu kiekiu muilo ir vandens. Jeigu sudirginama oda: kreiptis į gydytoją. Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

Buferinis tirpalas ATL



Atsargiai! Nestipriai dirgina odą. Jeigu sudirginama oda: kreiptis į gydytoją.

Buferinis tirpalas AW1



Sudėtyje yra: guanidino hidrochlorido. Atsargiai! Kenksminga prarijus arba įkvėpus. Dirgina odą. Sukelia smarkų akių dirginimą. Pasijutus blogai, skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. Turinį/talpyklą išmesti patvirtintoje atliekų šalinimo įmonėje. Nusivilkti užterštus drabužius ir išskalbti prieš vėl juos apsivelkant. Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/naudoti akių (veido) apsaugos priemones.

Proteinazė K



Sudėtyje yra: proteinazės K. Pavojus! Nestipriai dirgina odą. Įkvėpus gali sukelti alerginę reakciją, astmos simptomus arba apsunkinti kvėpavimą. Stengtis neįkvėpti dulkių/dūmų/dujų/rūko/garų/aerozolio. Turinį/talpyklą išmesti patvirtintoje atliekų šalinimo įmonėje. Jeigu pasireiškia respiraciniai simptomai: skambinti į APSINUODIJIMŲ KONTROLĖS IR INFORMACIJOS BIURĄ arba kreiptis į gydytoją. **ĮKVĖPUS:** jeigu nukentėjusiajam sunku kvėpuoti, išnešti jį į gryną orą; jam būtina ramybė ir padėtis, leidžianti laisvai kvėpuoti. Naudoti kvėpavimo takų apsaugos priemones.

Reagentų laikymas ir naudojimas

Gavus „QIAamp MinElute“ kolonėles, jas reikia laikyti 2–8 °C temperatūroje ir suvartoti iki ant rinkinio pakuotės dėžės nurodytos galiojimo pabaigos datos.

Visus buferinius tirpalus galima laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C), jie yra stabilūs iki rinkinio galiojimo pabaigos datos. Tačiau atskiestus AW1 ir AW2 buferinius tirpalus galima laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C) iki 1 metų arba iki rinkinio galiojimo pabaigos datos, atsižvelgiant į tai, kuris terminas yra trumpesnis.

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinyje yra paruošto naudoti proteinazės K tirpalo, kuris yra pateikiamas specialioje talpykloje. Laikant kambario temperatūroje (15–25 °C), proteinazė K yra stabili iki rinkinio galiojimo pabaigos datos.

Mėginių naudojimas ir laikymas

Siekiant sumažinti DNR fragmentaciją, gali būti naudojamos standartinės fiksavimo formaline ir įliejimo parafine procedūros:

- Pašalinę chirurginiu būdu, kuo greičiau fiksukite audinio mėginius formaline, kaip nurodyta laboratorijos taisyklėse (įprastai tinka 10% neutralus buferinis formalinas).
- Fiksavimo laikas: 14–24 val. Ribokite fiksavimo trukmę, nes ilgesnis fiksavimas (pvz., >24 val.) gali lemti didesnę DNR fragmentaciją ir prastus tolesnių tyrimų rezultatus).
- Prieš įliedami mėginius, kruopščiai atlikite jų dehidrataciją (formalino likučiai gali pabloginti proteinazės K ardymo savybes).

Atliekamas DNR eliuavimas ATE buferiniame tirpale ir jį iš karto paruošiama naudoti amplifikacijos reakcijose arba laikyti (sąlygos priklauso nuo naudotojo reikalavimų). Rekomenduojamas laikymo sąlygas atliekant konkrečius QIAGEN tyrimus žr. atitinkamuose rinkinių vadovuose.

Procedūra

Svarbi informacija prieš pradedant

- Visi „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinio sudėtyje esantys reagentai numatyti naudoti tik su kitais reagentais iš to paties „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinio. Norint užtikrinti optimalų rinkinio veikimą, negalima naudoti reagentų pakaitalų.
- Gavę rinkinį, patikrinkite, ar audinio komponentai yra nepažeisti. Jei pakuotės arba buferinio tirpalo buteliukai yra pažeisti, kreipkitės į QIAGEN techninės pagalbos tarnybą arba vietinį platintoją. Išsiliejus skysčiui, žr. „Įspėjimai ir atsargumo priemonės“, 10 psl. Nenaudokite pažeistų rinkinio komponentų, nes jie gali turėti neigiamos įtakos rinkinio veiksmingumui.
- Nenaudokite komponentų iš kitų rinkinių, nebent partijų numeriai visiškai sutampa.
- Rinkinio reagentus saugokite nuo mikrobiologinės taršos.
- Šį rinkinį gali naudoti tik darbuotojai, susipažinę su in vitro diagnostikos laboratorijos procedūromis.
- Dirbdami su reagentais ir mėginiais, visuomet mūvėkite lateksines arba vinilines pirštines, kad išvengtumėte taršos nuo odos paviršiaus arba dulketos laboratorijos įrangos. Ant rankų ir dulkių dalelėse gali būti bakterijų ir pelėsių, kurie yra dažnai pasitaikantys taršos šaltiniai. Dažnai keiskite pirštines ir laikykite mėgintuvėlius uždarytus.
- Nenaudojamus buferinius tirpalus, tekantį skystį ir mėginių likučius reikia išmesti laikantis vietinių taisyklių reikalavimų.
- Jei naudojate savo plastikinius indelius, gryninimo procedūros metu rekomenduojama naudoti nesulaikančius mėginio 1,5–2 ml vienkartinius kūginius polipropileno mėgintuvėlius be DNazės/RNazės su saugiais dangteliais.
- Centrifugavimo veiksmus atlikite kambario temperatūroje (15–25 °C).

- Visus buferinius tirpalus reikia laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C). Prieš naudojant, juos reikia gerai išmaišyti.
- Atlikdami 11 veiksmą, nustatykite 56 °C termostatinio maišytuvo ar kaitinamo orbitinio inkubatoriaus temperatūrą. Jei termostatinio arba kaitinamo orbitinio inkubatoriaus nėra, vietoje jų galima naudoti kaitinimo bloką arba vandens vonelę.
- Jei AL buferiniame tirpale arba ATL buferiniame tirpale yra nuosėdų, ištirpinkite jas pašildydami iki 70°C ir švelniai kratydami.
- AW1 buferinis tirpalas ir AW2 buferinis tirpalas turi būti paruošti laikantis toliau pateiktų nurodymų.
- Siekdama užtikrinti kokybės kontrolę, QIAGEN atlieka funkcinį kiekvienos atskiros rinkinių partijos tikrinimą. Todėl nemaišykite skirtingų partijų reagentų ir kartu nenaudokite skirtingų reagentų partijų reagentų.

Buferinių tirpalų ruošimas

ATL buferinio tirpalo ruošimas

- Prieš pradėdami procedūrą, patikrinkite, ar buferiniame tirpale ATL nesusidarė nuosėdų. Jei reikia, ištirpinkite jas šildydami 70 °C temperatūroje ir atsargiai pakratydami.

AL buferinio tirpalo ruošimas

- Prieš pradėdami procedūrą, patikrinkite, ar buferiniame tirpale AL nesusidarė nuosėdų. Jei reikia, ištirpinkite jas šildydami 70 °C temperatūroje ir atsargiai pakratydami.

AW1 buferinio tirpalo ruošimas

- Įpilkite 25 ml etanolio (96–100%) į buteliuką, kuriame yra 19 ml koncentruoto buferinio tirpalo AW1. Pažymėkite ant buteliuko esančią etiketę, tokiu būdu nurodydami, kad buvo įpilta etanolio. Atskiestą buferinį tirpalą AW1 galima laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C) iki 1 metų arba iki rinkinio galiojimo pabaigos datos, atsižvelgiant į tai, kuris terminas yra trumpesnis. Mes rekomenduojame pasižymėti atskiedimo datą ant buferinio tirpalo etiketės.

Pastaba. Prieš pradėdami procedūrą, kratydami sumaišykite atskiestą buferinį tirpalą AW1.

AW2 buferinio tirpalo ruošimas

- Įpilkite 30 ml etanolio (96–100%) į buteliuką, kuriame yra 13 ml koncentruoto buferinio tirpalo AW2. Pažymėkite ant buteliuko esančią etiketę, tokiu būdu nurodydami, kad buvo įpilta etanolio. Atskiestą buferinį tirpalą AW2 galima laikyti kambario temperatūroje (15–25 °C) iki 1 metų arba iki rinkinio galiojimo pabaigos datos, atsižvelgiant į tai, kuris terminas yra trumpesnis. Mes rekomenduojame pasižymėti atskiedimo datą ant buferinio tirpalo etiketės.

Pastaba. Prieš pradėdami procedūrą, kratydami sumaišykite atskiestą buferinį tirpalą AW2.

Pradinė medžiaga

Pradinė medžiaga DNR gryninti yra FFPE audinio pjūviai (pageidautina švieži). Vieną mėginį gali sudaryti keli pjūviai. Jei neturite informacijos apie pradinės medžiagos kilmę, rekomenduojame vienam mėginiui ruošti naudoti ne daugiau nei tris pjūvius.

Laboratorijoje atlikdamas bet kurią procedūrą, naudotojas turi parinkti optimalų pjūvių skaičių, pjūvio storį ir pjūvio paviršiaus plotą. Jei rinkinį naudojate kartu su QIAGEN tyrimais, nurodymus žr. atitinkamame vadove.

Darbinės procedūros siekiant išvengti kryžminės taršos

Kadangi nukleorūgšties amplifikacijos technologijos yra jautrios, dirbant su „QIAamp MinElute“ kolonėlėmis būtina imtis toliau nurodytų atsargumo priemonių, kurios padės išvengti kryžminės mėginių taršos:

- Į mėgintuvėlius nedėkite per didelio audinių kiekio.
- Grandydami audinį, mėginiams naudokite skirtingus skalpelius.
- Elkitės atsargiai dėdami mėginį ar pildami tirpalą į „QIAamp MinElute“ kolonėlę. Pipetuokite mėginį į „QIAamp MinElute“ kolonėlę taip, kad nesušlapintumėte kolonėlės krašto.
- Perkeldami skysčius, visada keiskite pipečių antgalius. Rekomenduojame naudoti pipečių antgalius su aerosoliniais barjeriais.
- Atlikdami mėginio plovimo veiksmus visuomet naudokite naujus plovimo mėgintuvėlius.
- Prieš purtydami ir centrifuguodami įsitikinkite, kad mėgintuvėlių dangteliai yra gerai uždaryti.
- Prieš centrifuguodami įsitikinkite, kad QIAamp MinElute kolonėlė yra gerai uždaryta.
- Atlikę impulsino purtymo ir inkubavimo 90 °C veiksmus, trumpai centrifuguokite mikrocentrifugos mėgintuvėlius, kad pašalintumėte lašus nuo dangtelių vidinės pusės.
- „QIAamp MinElute“ kolonėles atidarykite po vieną ir būkite atsargūs, kad nesusidarytų aerosolis.
- Dirbdami su mėginiais, visada keiskite skalpelius.
- Perkeldami skysčius, visada keiskite pipečių antgalius. Siekiant išvengti kryžminės taršos, rekomenduojame naudoti pipečių antgalius su aerosoliniais barjeriais ir nenaudoti kelių pakopų pipečių.
- Visada naudokite vienkartinės pirštines ir reguliariai tikrinkite, ar jos nėra užterštos mėginio medžiaga. Jei įtariate, kad jos gali būti užterštos, išmeskite pirštines.
- Mėgintuvėlius atidarykite po vieną.

Centrifugavimas

„QIAamp MinElute“ kolonėlės telpa į daugumą standartinių 1,5–2 ml mikrocentrifugos mėgintuvėlių. Atskirai galima įsigyti papildomų 2 ml plovimo mėgintuvėlių (QIAGEN, kat. nr. 19201). Siekiant sumažinti centrifugos keliamą triukšmą, „QIAamp MinElute“ kolonėlių centrifugavimas atliekamas apie 6000 x g greičiu. Centrifiguojant didžiausiu greičiu, DNR išeiga nebus didesnė. Tačiau „QIAamp MinElute“ centrifugavimas didžiausiu greičiu būtinas atliekant du procedūros veiksmus: sausojo centrifugavimo veiksmą išplovus membranas ir eliuavimo veiksmą. Be to, centrifugavimas didžiausiu greičiu būtinas nusodinant mėginį atlikus apdoravimo ksilenu ir plovimo etanolio veiksmą.

Visi centrifugavimo veiksmai turi būti atliekami kambario temperatūroje (15–25 °C). Nedidelė temperatūra centrifugavimo metu gali lemti neoptimalų išskyrimą.

„QIAamp MinElute“ kolonėlių apdorojimas mikrocentrifugoje

- Prieš dėdami į centrifugą, visa uždarykite „QIAamp MinElute“ kolonėles.
- Nepalieskite „QIAamp MinElute“ kolonėlės membranos pipetės antgaliu.
- Išplautose frakcijose gali būti pavojingų atliekų, todėl jas reikia tinkamai išmesti.
- Siekiant užtikrinti efektyvų vienalaikį daugelio mėginių apdorojimą, rekomenduojame stovėlį užpildyti plovimo mėgintuvėliais, į kuriuos po centrifugavimo būtų perkeliamos „QIAamp MinElute“ kolonėlės. Panaudotus plovimo mėgintuvėlius su išplauta medžiaga būtų galima išmesti, o į centrifugą būtų galima įdėti naujus plovimo mėgintuvėlius su „QIAamp MinElute“ kolonėlėmis.
- Viso proceso metu mėginiai turi būti visiškai kontroliuojami.

Išgrynintos DNR eliuavimas

Atliekant tolesnius tyrimus, kuriems reikalingas nedidelis pradinis tūris, (pvz., kai kuriuos PGR tyrimus) esant labiau koncentruotam eliuatui gali padidėti tyrimo jautrumas, tačiau gali padidėti ir potencialių inhibitorių koncentracija.

Padidėjus eliuavimo tūriui sumažės DNR koncentracija eliuate.

Atkurto eliuato tūris gali būti apie 5 μ l mažesnis nei „QIAamp MinElute“ kolonėlėje buvusio buferinio tirpalo ATE tūris. Pvz., esant 20 μ l eliuavimo tūriui gaunama ≥ 15 μ l eliuato. Atkurto eliuato tūris priklauso nuo mėginio kilmės.

Naudotojas turi užtikrinti, kad eliuavimo tūris būtų optimalus visoms laboratorijoje atliekamoms procedūroms. Informacijos apie rekomenduojamus eliuavimo tūrius atliekant konkrečius QIAGEN tyrimus žr. rinkinių vadovuose.

Išeiga gali padidėti, jei kolonėlė bus inkubuojama su buferiniu tirpalu ATE kambario temperatūroje, pvz., 5 minutes prieš centrifugavimą. Atlikus eliuavimą, DNR galima surinkti į 1,5 ml eliuavimo mėgintuvėlius (pateikti). Eliuavimo būdu gautos DNR laikymo sąlygos priklauso nuo naudotojo reikalavimų. Rekomenduojamas laikymo sąlygas atliekant konkrečius QIAGEN tyrimus žr. rinkinių vadovuose.

Protokolas: Genominės DNR izoliavimas iš FFPE audinio pjūvių

Procedūra

1. Naudodami skalpelį, pašalinkite perteklinį parafiną nuo mėginio bloko.
2. Laikydami standartinės laboratorijos praktikos reikalavimų, atlikite pjūvius (žr. „Pradinė medžiaga“, 15 psl. Laboratorijoje atlikdamas bet kurią procedūrą, naudotojas turi parinkti optimalų pjūvių skaičių, pjūvio storį ir pjūvio paviršiaus plotą. Visos procedūros metu mėginiai turi būti visiškai kontroliuojami.
3. Naudodami sterilų skalpelį, į lizės mėgintuvėlį (pateiktas) nugrandykite audinį nuo pjūvių. Į mėgintuvėlį sudėkite visą galimą audinį. Į mėginį įpilkite 1 ml ksileno, uždarykite dangtelį ir gerai sukratykite, kol parafinas ištirps (pvz., apie 10 sek.). Įsitinkinkite, kad mėgintuvėlis yra gerai uždarytas, kad neišsilietų ksilenas, išvengtumėte kryžminės mėginių taršos ir galimo sąlyčio su ksilenu.

Pastaba. Ksilena naudokite traukos spintose ar kituose tinkamuose darbu įrenginiuose.

4. Centrifuguokite visu greičiu kambario temperatūroje apie 2 min., kad surinktumėte audinio granules. Jei audinio granulės nesusiformavimo, šį veiksmą pakartokite.

Pastaba. Nedidelė temperatūra centrifugavimo metu gali lemti neoptimalų išskyrimą.

5. Pipetuodami pašalinkite supernatantą ir jį išmeskite. Surinkite granules.

Supernatante yra ksileno, kuris yra pavojingos atliekos ir turi būti išmestas laikantis atitinkamų vietinių taisyklių reikalavimų.

6. Į audinio granules įpilkite 1 ml etanolio (96–100%) ir kratydami gerai sumaišykite.

Etanolis iš mėginio pašalina ksileno likučius ir turi būti tinkamai tvarkomas.

7. Centrifuguokite visu greičiu kambario temperatūroje apie 2 min.

Pipetuodami pašalinkite supernatantą. Nepašalinkite granulių.

Naudodami pipetę plonu galu atidžiai pašalinkite etanolio likučius. Atidarykite mėgintuvėlį ir inkubuokite 15–40 °C temperatūroje, kol išgaruos visi etanolio likučiai. Pašalinti visą etanolį yra ypač svarbu, kad išskyrimas būtų sėkmingas.

Pastaba. Esant mažesnei inkubavimo temperatūrai pailgėja garavimo laikas, o esant aukštai temperatūrai granulės gali pernelyg išdžiūti, todėl jas gali būti sudėtinga suspenduoti.

8. Suspenduokite granules 180 µl buferinio tirpalo ATL. Pridėkite 20 µl proteinazės K ir kratydami sumaišykite.

Pastaba. Siekiant užtikrinti didžiausią išeią, granules reikia gerai suspenduoti buferiniame tirpale ATL.

9. 56 °C ± 3 °C temperatūroje inkubuokite apie 1 val. (kol įvyks visiška mėginio lizė).

10. 90 °C ± 5 °C temperatūroje inkubuokite apie 1 val. ± 5 min.

Buferiniame tirpale ATL inkubuojant 90 °C temperatūroje iš dalies atstatomi nukreorūgčių pokyčiai dėl formaldehido. Trumpesnis inkubavimo laikas arba mažesnė inkubavimo temperatūra gali turėti įtakos DNR kokybei ir kiekiui. Jei naudojate tik vieną kaitinimo bloką, po inkubavimo 56 °C temperatūroje palikite mėginį kambario temperatūroje, kol kaitinimo blokas pasieks 90 °C.

11. Trumpai centrifuguokite mėgintuvėlį, kad pašalintumėte dangtelio viduje esančius lašus.

12. Į mėginį įpilkite 200 µl buferinio tirpalo AL ir kratydami gerai sumaišykite. Tuomet įpilkite 200 µl etanolio (96–100%) ir kratydami dar kartą gerai sumaišykite.

Norint gauti homogeninį tirpalą, būtina, kad mėginys, buferinis tirpalas AL ir etanolis būtų nedelsiant kruopščiai sumaišyti juos kratant ar pipetuoiant. Buferinį tirpalą AL ir etanolį galima sumaišyti iš anksto ir supilti kartu, tokiu būdu sutaupant laiką, kai yra apdorojami keli mėginiai. Supylus buferinį tirpalą AL ir etanolį gali susidaryti baltos nuosėdos. Šios nuosėdos neturi įtakos „QIAamp“ procedūrai. Visada naudokite šviežią mišinį, o panaudoję iš karto išmeskite.

13. Trumpai centrifuguokite mėgintuvėlį, kad pašalintumėte dangtelio viduje esančius lašus.
14. Atidžiai, kad nesudrėkintumėte krašto, perpilkite visą lizatą į „QIAamp MinElute“ kolonėlę (2 ml plovimo mėgintuvėlyje), uždarykite dangtelį ir centrifuguokite apie 6000 x g greičiu ≥ 1 min. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį (pateiktas) ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį su išplauta medžiaga.
- Jei atlikus centrifugavimą ne visas lizatas pateko pro membraną, centrifuguokite dar kartą didesniu greičiu, kol „QIAamp MinElute“ kolonėlė bus tuščia.
15. Atsargiai atidarykite „QIAamp MinElute“ kolonėlę ir įpilkite 500 μ l atskiesto buferinio tirpalo AW1 taip, kad nesudrėkintumėte krašto. Uždarykite dangtelį ir centrifuguokite apie 6000 x g greičiu ≥ 1 min. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį su išplauta medžiaga.
16. Atsargiai atidarykite „QIAamp MinElute“ kolonėlę ir įpilkite 500 μ l atskiesto buferinio tirpalo AW2 taip, kad nesudrėkintumėte krašto. Uždarykite dangtelį ir centrifuguokite apie 6000 x g greičiu ≥ 1 min. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 2 ml plovimo mėgintuvėlį ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį su išplauta medžiaga.
- Venkite sąlyčio tarp „QIAamp MinElute“ kolonėlės ir išplautos medžiagos. Subalansuokite centrifugos rotorį. Kai kurie centrifugos rotoriai lėtėjimo metu gali vibruoti, todėl galimas išplautos medžiagos, kurioje yra etanolio, sąlytis su „QIAamp MinElute“ kolonėle. Išimdami „QIAamp MinElute“ kolonėlę ir plovimo mėgintuvėlį iš rotoriaus būkite atsargūs, kad neįvyktų išplautos medžiagos ir „QIAamp MinElute“ kolonėlės sąlytis.
17. Centrifuguokite visu greičiu (apie 20000 x g) apie 3 min., kad išdžiovintumėte membraną. Į eliuatą patekęs etanolis gali turėti neigiamos įtakos kai kuriems tolesniems tyrimams.

18. Įdėkite „QIAamp MinElute“ kolonėlę į švarų 1,5 ml eliuavimo mėgintuvėlį (pateiktas) ir išmeskite plovimo mėgintuvėlį su išplauta medžiaga. Atsargiai atidarykite „QIAamp MinElute“ kolonėlės dangtelį ir įpilkite 20–200 µl buferinio tirpalo ATE į membranos centrą.

SVARBU. Jei eliuavimo metu naudojate nedidelį tūrį (<50 µl), buferinį tirpalą ATE pilkite į membranos centrą, kad užtikrintumėte visišką surištos DNR eliuavimą. „QIAamp MinElute“ kolonėlės suteikia galimybę eliuavimo metu naudoti įvairius tūrius. Pasirinkite tūrį atsižvelgdami į toliau atliekamų tyrimų reikalavimus. Eliuato tūris bus apie 5 µl mažesnis nei kolonėlėje buvusio eliuavimo tirpalo tūris.

19. Uždarykite dangtelį ir inkubuokite kambario temperatūroje (15–25 °C) mažiausiai 1 min. Centrifuguokite visu greičiu (apie 20000 x g) ≥1 min.

Prieš centrifugavimą inkubavus „QIAamp MinElute“ kolonėlę su buferiniu tirpalu ATE apie 5 min kambario temperatūroje, gali padidėti DNR išeiga.

Kokybės kontrolė

Vadovaujantis QIAGEN ISO sertifikuota kokybės valdymo sistema, tikrinamos kiekvienos „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinių partijos iš anksto numatytos savybės, taip užtikrinant pastovią gaminio kokybę.

Apribojimai

Rinkinio genominės DNR izoliavimo savybės buvo nustatytos naudojant formaline fiksuotus ir parafine įlietus audinius (FFPE audinius).

Naudotojas atsako už sistemos efektyvumo užtikrinimą, jei laboratorijoje atliekamos procedūros, kurių neapima šiame vadove aprašyti QIAGEN efektyvumo tyrimai.

Siekiant sumažinti neigiamo poveikio diagnostiniams rezultatams riziką, reikia naudoti reikiamas kontrolės priemones atliekant tolesnius tyrimus. Papildomam patvirtinimui rekomenduojamos „International Conference on Harmonization of Technical Requirements“ (ICH) (Techninių reikalavimų derinimo tarptautinės konferencijos) gairės, pateiktos dokumente „ICH Q2 (R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology“ (Analizės procedūrų patvirtinimas: tekstas ir metodologija).

Visus gautus diagnostinius rezultatus reikia interpretuoti kartu su kitais klinikiniais ar laboratorijoje gautais rezultatais.











Naudojant „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinį, mėginyje esanti RNR gali būti išgryninta kartu su DNR.

Veikimo charakteristikos

„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinio veikimo charakteristikas žr. www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.

Simboliai

Ant pakuotės ir etikečių gali būti pateikti šie simboliai:

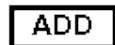
Simbolis	Simbolio aprašas
	Sudėtyje yra pakankamas reagentų kiekis <N> reakcijoms atlikti
	Tinka iki
	„In vitro“ diagnostikos medicinos prietaisas
	Gavus
	Katalogo numeris
	Serijos numeris
	Medžiagos numeris
	Komponentai
	Sudėtyje yra
	Numeris

Simbolis**Simbolio aprašas**

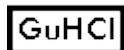
Į buteliuką įpylę etanolio, užsirašykite datą



Etanolis



Pridėjimas



Guanidino hidrochloridas



Maleino rūgštis



Globalus prekės numeris



Temperatūros apribojimai



Gamintojas



Skaitykite naudojimo instrukcijas



Dėmesio

Kontaktinė informacija

Prireikus techninės pagalbos ar papildomos informacijos, apsilankykite mūsų techninės pagalbos centre adresu www.qiagen.com/Support, skambinkite tel. 00800-22-44-6000 arba kreipkitės į vieną iš mūsų QIAGEN techninio aptarnavimo skyrių ar vietinių pardavėjų (žr. galinį viršelį arba apsilankykite www.qiagen.com).

Užsakymo informacija

Produktas	Turinys	Kat. Nr.
„QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinys, skirtas genominei DNR išgryninti iš parafine įlietų audinių		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNR preparatų: 50 „QIAamp MinElute [®] “ kolonėlių, proteinazė K, buferiniai tirpalai, plovimo mėgintuvėliai (2 ml), eliuavimo mėgintuvėliai (1,5 ml), lizės mėgintuvėliai (2 ml)	60404

Naujausia informacija apie licencijavimą ir tam tikrų produktų garantinių įsipareigojimų atsisakymai pateikti atitinkamame QIAGEN rinkinio vadove arba naudotojo vadove. QIAGEN rinkinio vadovai ir naudotojo vadovai pasiekiami adresu www.qiagen.com arba jų galite paprašyti QIAGEN techninės pagalbos tarnybos ar vietinio platintojo.

Prekių ženklai: „QIAGEN“SM, „Sample to Insight“SM, „QIAamp“SM, „MinElute“SM („QIAGEN Group“); „Eppendorf“SM („Eppendorf AG“).

Ribotoji licencinė sutartis dėl „QIAamp DSP DNA FFPE Tissue“ rinkinio vadovo

Šio produkto naudojimas reiškia pirkėjo ar naudotojo sutikimą su šiomis sąlygomis:

1. Produktą galima naudoti tik vadovaujantis protokolais, pateiktais su šiuo produktu, šiuo vadovu ir tik su rinkinyje esančiais komponentais. QIAGEN nesuteikia jokios intelektinės nuosavybės licencijos naudoti ar įtraukti pridėtus šio rinkinio komponentus su į šį rinkinį neįeinančiais komponentais, išskyrus aprašytus protokoluose, pateiktuose su šiuo produktu, šiame vadove ir papildomuose protokoluose, esančiuose www.qiagen.com. QIAGEN vartotojams pateikiami keli papildomi protokolai. Šiuos protokolus QIAGEN kruopščiai patikrino ir optimizavo. QIAGEN neteikia garantijų, kad šie protokolai nepažeidžia trečiųjų šalių teisių.
2. Išskyrus licencijose nurodytus atvejus, QIAGEN nesuteikia garantijos, kad šis rinkinys ir (arba) jo naudojimas nepažeis trečiųjų šalių teisių.
3. Rinkiniui ir jo komponentams suteikta licencija naudoti vieną kartą; pakartotinai naudoti, atnaujinti ar perparduoti negalima.
4. QIAGEN aiškiai atsisako bet kokių kitų išreikštų ar numanomų licencijų, išskyrus aiškiai nurodytas licencijas.
5. Rinkinio pirkėjas ir naudotojas sutinka nesimti ir neleisti niekam kitam imtis veiksmų, kurie galėtų paskatinti arba palengvinti prieš tai nurodytus draudžiamus veiksmus. QIAGEN gali priversti vykdyti šios Ribotosios licencinės sutarties draudimus bet kuriame teisme ir atgauti visas tyrimo ir teismo išlaidas, įskaitant išlaidas advokatams, pateikusi ieškinį dėl šios Ribotosios licencinės sutarties vykdymo arba su šiuo rinkiniu ir (arba) jo komponentais susijusių teisių į savo intelektinę nuosavybę.

Naujausias licencijos sąlygas žr. www.qiagen.com.

17-02 HB-0414-004 © QIAGEN, 2017. Visos teisės saugomos.

Užsakymas www.qiagen.com/contact | Techninė pagalba support.qiagen.com | Svetainė www.qiagen.com