

# Scheda del protocollo QIASymphony SP

## Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP e Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

### Informazioni generali

Per uso diagnostico in vitro.

Questi protocolli sono studiati per la purificazione del DNA totale da tessuti e tessuti FFPE, ossia fissati in formalina e inclusi in paraffina, utilizzando il QIASymphony® SP e il kit QIASymphony DSP DNA Mini. Sono attualmente in fase di sviluppo e saranno presto disponibili protocolli per cellule in coltura e colture batteriche.

Si consiglia di utilizzare il protocollo a basso contenuto (LC) o ad alto contenuto (HC) a seconda del tipo di campione. I tessuti producono maggiori rese di DNA se processati con il protocollo ad alto contenuto, ma se è necessaria un'elevata concentrazione di DNA, è possibile utilizzare il protocollo a basso contenuto in combinazione con un ridotto volume di eluizione (50 µl). Per il tessuto FFPE si consiglia di utilizzare il protocollo a basso contenuto.

### Protocollo a basso contenuto

|  |   |
|--|---|
| <b>Kit</b>                                   | QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat. n. 937236)   |
| <b>Campioni</b>                              | Tessuto FFPE e tessuto*<br><br>In una preparazione possono essere combinate fino a 4 sezioni di tessuto FFPE, ciascuna con spessore fino a 10 µm, oppure 8 sezioni con spessore fino a 5 µm e superficie fino a 250 mm <sup>2</sup> . |
| <b>Nome del protocollo</b>                   | Tissue_LC_200_V7_DSP  |
| <b>Set di controllo del test predefinito</b> | ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP  |
| <b>Volume di eluizione</b>                   | 50 µl, 100 µl, 200 µl o 400 µl  |
| <b>Versione del software necessaria</b>      | Versione 4.0  |

\* Vedere il protocollo ad alto contenuto per informazioni sui campioni di tessuto.

Aprile 2012



Sample & Assay Technologies

## Protocollo ad alto contenuto

|  |   |
|--|---|
| <b>Kit</b>                                   | QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (cat. n. 937236)  |
| <b>Campioni</b>                              | Tessuto<br><br>In mancanza di informazioni sulla resa prevista, consigliamo di iniziare con un campione di 25 mg. A seconda della resa ottenuta è possibile aumentare le dimensioni del campione nelle successive preparazioni. |
| <b>Nome del protocollo</b>                   | Tissue_HC_200_V7_DSP  |
| <b>Set di controllo del test predefinito</b> | ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP  |
| <b>Volume di eluizione</b>                   | 100 µl, 200 µl o 400 µl   |
| <b>Versione del software necessaria</b>      | Versione 4.0  |

## Materiale necessario ma non in dotazione

### Per tutti i tipi di campioni

- Tampone ATL, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, cat. n. 939016)
- Se è necessario DNA libero da RNA: RNasi A priva di DNasi (soluzione madre di 100 mg/ml)

### Per il tessuto FFPE (deparaffinazione senza xilene)

- Soluzione di deparaffinazione (Deparaffinization Solution, cat. n. 939018)

### Per il tessuto FFPE (deparaffinazione con xilene)

- Xilene (99–100%)
- Etanolo (96–100%)\*

\* Non usare alcool denaturato, in quanto contiene altre sostanze quali metanolo o metiletilchetone.

## Cassetto "Sample" (Campione)

|   |   |
|---|---|
| <b>Tipo di campione</b>                 | Tessuto FFPE e tessuto  |
| <b>Volume d'ingresso del campione</b>   | 220 $\mu$ l (necessario per campione, per protocollo)*  |
| <b>Volume di campione processato</b>    | 200 $\mu$ l   |
| <b>Provette per campioni primarie</b>   | n/a   |
| <b>Provette per campioni secondarie</b> | Per maggiori informazioni consultare <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .   |
| <b>Inseri</b>                           | Dipendono dal tipo di provetta per campioni utilizzata; per maggiori informazioni consultare <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> . |

\* Poiché il trasferimento dei campioni dei protocolli ad alto e basso contenuto viene effettuato senza rilevamento del livello di liquido, il sistema non riconosce se il volume del campione è inferiore a 220  $\mu$ l. Occorre pertanto accertarsi che il volume d'ingresso del campione sia 220  $\mu$ l.

n/a = non applicabile

## Cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo)

|                                       |   |
|---------------------------------------|---|
| <b>Posizione A1 e/o A2</b>            | Cartuccia reagenti  |
| <b>Posizione B1</b>                   | n/a   |
| <b>Supporto rack per puntali 1-17</b> | Puntali con filtro monouso, 200 $\mu$ l o 1500 $\mu$ l                                  |
| <b>Supporto per box unitari 1-4</b>   | Box unitari contenenti cartucce per la preparazione dei campioni o coperchi per 8 barre |

n/a = non applicabile

## Cassetto "Waste" (Materiali di scarto)

|   |                                       |
|---|---------------------------------------|
| <b>Supporto per box unitari 1-4</b>                   | Box unitari vuoti                     |
| <b>Supporto per sacchetto dei materiali di scarto</b> | Sacchetto dei materiali di scarto     |
| <b>Supporto per contenitore dei residui liquidi</b>   | Contenitore dei residui liquidi vuoto |

## Cassetto "Eluate" (Eluito)

|   |   |
|---|---|
| <b>Rack per eluizione (consigliamo di utilizzare l'apertura 1, posizione di raffreddamento)</b> | Per maggiori informazioni consultare <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> . |
|---|---|

## Plastica da laboratorio occorrente

|  | Un lotto, 24 campioni* | Due lotti, 48 campioni* | Tre lotti, 72 campioni* | Quattro lotti, 96 campioni* |
|--|------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| <b>Puntali con filtro monouso, 200 µl<sup>†‡</sup></b>       | 26                     | 50                      | 74                      | 98                          |
| <b>Puntali con filtro monouso, 1500 µl<sup>†‡</sup></b>      | 72                     | 136                     | 200                     | 264                         |
| <b>Cartucce per la preparazione dei campioni<sup>§</sup></b> | 21                     | 42                      | 63                      | 84                          |
| <b>Coperchi per 8 barre<sup>¶</sup></b>                      | 3                      | 6                       | 9                       | 12                          |

\* L'impiego di meno di 24 campioni per lotto riduce il numero di puntali con filtro monouso necessari per ogni processazione.

† Ci sono 32 puntali con filtro in ogni rack corrispondente.

‡ La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

§ Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

<sup>†</sup> Ci sono dodici coperchi per 8 barre in ogni box unitario.

**Nota:** Le quantità indicate per i puntali con filtro possono variare da quelle visualizzate sul touch screen a seconda delle impostazioni. Si consiglia di caricare la massima quantità possibile di puntali.

## Volume di eluizione

Il volume di eluizione viene selezionato sul touch screen. In base al tipo di campione e al contenuto di DNA, il volume di eluito finale può variare di ben 15  $\mu$ l in meno rispetto al volume selezionato. Data la possibile variazione del volume di eluito, si consiglia di controllare l'effettivo volume di eluito quando si utilizza un sistema automatizzato di setup del test che non verifica il volume di eluito prima del trasferimento. L'eluizione in volumi inferiori aumenta la concentrazione finale di DNA, ma riduce leggermente la resa. Si consiglia di utilizzare un volume di eluizione adeguato alla prevista applicazione a valle.

## Preparazione dei campioni

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le relative schede di sicurezza (MSDS), reperibili presso il fornitore.

### Punto importante prima di iniziare

- Le particelle magnetiche del QIAasympyphony eseguono la procedura di purificazione sia sull'RNA che sul DNA se entrambi sono presenti nel campione. Se è necessario DNA libero da RNA, aggiungere RNasi A al campione nella fase indicata nel rispettivo protocollo di pretrattamento.

### Prima di iniziare

- Controllare se il tampone ATL presenta del precipitato bianco. Se necessario, incubare per 30 minuti a 37°C agitando di tanto in tanto per sciogliere il precipitato.
- Impostare un thermomixer o un agitatore/incubatore alla temperatura necessaria per il rispettivo pretrattamento.

## Tessuti

Per la purificazione del DNA possono essere utilizzati tessuti freschi o congelati. La resa e la qualità del DNA ottenuta dipenderanno dal tipo di tessuto, dalla fonte e dalle condizioni di conservazione. Il tessuto fresco può essere tagliato in piccoli pezzi e conservato a -20°C o -80°C prima della processazione. In linea generale, si consiglia di utilizzare il protocollo ad alto contenuto, in quanto consente di ottenere maggiori rese di DNA. Il protocollo a basso contenuto in combinazione con il volume di eluizione di 50  $\mu$ l è consigliato unicamente se sono necessarie elevate concentrazioni di

DNA per l'analisi a valle. In mancanza di informazioni sulla resa prevista, si consiglia di iniziare con un campione di 25 mg utilizzando il protocollo ad alto contenuto e il volume di eluizione di 200  $\mu$ l. A seconda della resa ottenuta, è possibile aumentare le dimensioni del campione o ridurre il volume di eluizione nelle successive preparazioni. Si noti che sovraccaricando le preparazioni in combinazione con ridotti volumi di eluizione potrebbe verificarsi un trascinamento di particelle magnetiche nell'eluito, con conseguente compromissione della purezza del DNA e dell'analisi a valle.

## Protocollo di pretrattamento per il tessuto

1. **Trasferire il campione di tessuto in una provetta per microcentrifuga da 2 ml (non fornita).**
2. **Aggiungere 220  $\mu$ l di tampone ATL.**
3. **Aggiungere 20  $\mu$ l di proteinasi K e miscelare picchiando la provetta.**

**Nota:** Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

4. **Collocare la provetta in un thermomixer o agitatore/incubatore e incubare a 56°C agitando a 900 giri/min (oppure finché il tessuto non è completamente lisato).**

**Nota:** Il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti la lisi si completa nel giro di 3 ore. Se dopo 3 ore la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile o di lisati altamente viscosi, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 6. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.

5. **Se è necessario DNA genomico libero da RNA, aggiungere 4  $\mu$ l di RNasi A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente (15–25°C) prima di continuare con la fase 6.**
6. **Omogeneizzare il campione aspirandolo e rilasciandolo diverse volte con una pipetta.**

**Nota:** Se sono ancora presenti pezzi di materiale insolubile, centrifugare a 3000 x g per 1 minuto.

7. **Trasferire con cautela 220  $\mu$ l del supernatante in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIAasymphony SP.**

Per un elenco completo delle provette per campioni compatibili, visitare il sito [www.qiagen.com/goto/dsphanthbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphanthbooks). Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt, cat. n. 72.693 o 72.608).

## Tessuto FFPE

Le procedure standard di fissazione in formalina e inclusione in paraffina comportano sempre una significativa frammentazione degli acidi nucleici. Per limitare la portata della frammentazione del DNA accertarsi di:

- fissare i campioni in formalina al 4–10% il più velocemente possibile dopo il prelievo chirurgico
- utilizzare un tempo di fissazione di 14–24 ore (tempi di fissazione più lunghi comportano una più grave frammentazione del DNA con conseguente riduzione delle prestazioni dei test a valle)
- disidratare accuratamente i campioni prima dell'inclusione in paraffina (la formalina residua può inibire la digestione della proteinasi K)

Il materiale di partenza per la purificazione del DNA deve essere formato da sezioni appena tagliate di tessuto FFPE. In una preparazione possono essere processate fino a 4 sezioni, ciascuna con spessore fino a 10  $\mu\text{m}$ , oppure 8 sezioni con spessore fino a 5  $\mu\text{m}$  e superficie fino a 250  $\text{mm}^2$ . Se non si possiedono informazioni sulla natura del materiale di partenza, si consiglia di iniziare con non più di 3 sezioni in una sola preparazione. A seconda della resa e della purezza del DNA può essere possibile utilizzare fino a 8 sezioni nelle successive preparazioni.

## Protocollo di pretrattamento per il tessuto FFPE

### Deparaffinazione con soluzione di deparaffinazione

1. **Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocco campione.**
2. **Tagliare fino a 4 sezioni con spessore di 10  $\mu\text{m}$  oppure fino a 8 sezioni con spessore di 5  $\mu\text{m}$ .**

**Nota:** Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2–3 sezioni.

3. **Collocare immediatamente le sezioni in una provetta Sarstedt da 2 ml (non fornita, cat. n. 72.693 o 72.608) che sia compatibile con il portacampioni del QIASymphony SP.**
4. **Aggiungere 200  $\mu\text{l}$  di tampone ATL alle sezioni.**
5. **Aggiungere 20  $\mu\text{l}$  di proteinasi K.**

**Nota:** Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIASymphony DSP DNA Mini.

6. **Aggiungere 160  $\mu\text{l}$  o 320  $\mu\text{l}$  di soluzione di deparaffinazione (vedere tabella sotto) e miscelare su vortex.**

| Spessore delle sezioni | Numero di sezioni | Volume di soluzione di deparaffinazione |
|------------------------|-------------------|---|
| 5 $\mu\text{m}$        | 1–4               | 160 $\mu\text{l}$                       |
|                        | 5–8               | 320 $\mu\text{l}$                       |
| 10 $\mu\text{m}$       | 1–2               | 160 $\mu\text{l}$                       |
|                        | 3–4               | 320 $\mu\text{l}$                       |

- 7. Collocare la provetta in un thermomixer o agitatore/incubatore e incubare a 56°C per 1 ora agitando a 1000 giri/min finché il tessuto non è completamente lisato.**

**Nota:** Il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti la lisi si completa nel giro di 1 ora. Se dopo 1 ora la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 10. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.

- 8. Incubare a 90°C per 1 ora.**

**Nota:** L'incubazione a 90°C in tampone ATL inverte parzialmente la modifica della formaldeide degli acidi nucleici. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA. Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.

- 9. Se è necessario DNA genomico libero da RNA, aggiungere 2 µl di RNasi A (100 mg/ml) alla fase inferiore e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 10. Far raffreddare il campione a temperatura ambiente prima di aggiungere RNasi A.**
- 10. Centrifugare a massima velocità per 1 minuto a temperatura ambiente.**
- 11. Trasferire con cautela le provette (contenenti entrambi le fasi) nel portacampioni del QIASymphony SP.**

## **Deparaffinazione con xilene**

- 1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocco campione.**
- 2. Tagliare fino a 4 sezioni con spessore di 10 µm oppure fino a 8 sezioni con spessore di 5 µm.**

**Nota:** Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2–3 sezioni.
- 3. Collocare immediatamente le sezioni in una provetta per microcentrifuga da 1,5 o 2 ml (non fornita) e aggiungere 1 ml di xilene al campione. Chiudere il coperchio e agitare vigorosamente su vortex per 10 secondi.**
- 4. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.**
- 5. Rimuovere il supernatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.**
- 6. Aggiungere 1 ml di etanolo (96–100%) al pellet e miscelare su vortex.**

**Nota:** L'etanolo estrae lo xilene residuo dal campione.
- 7. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.**
- 8. Rimuovere il supernatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.**

**Nota:** Rimuovere con cautela l'etanolo residuo con un puntale per pipetta sottile.
- 9. Aprire la provetta e incubare a temperatura ambiente (15–25°C) per 10 minuti o finché tutto l'etanolo residuo non è evaporato.**



**Nota:** L'incubazione può essere effettuata a temperature fino a 37°C.

**10. Risospendere il pellet in 220 µl di tampone ATL.**

**11. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare su vortex.**

**Nota:** Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

**12. Incubare a 56°C per 1 ora (oppure finché il campione non è completamente lisato).**

**Nota:** Il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti la lisi si completa nel giro di 1 ora. Se dopo 1 ora la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 16. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.

**13. Incubare a 90°C per 1 ora.**

**Nota:** L'incubazione a 90°C in tampone ATL inverte parzialmente la modifica della formaldeide degli acidi nucleici. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA. Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.

**14. Centrifugare brevemente il campione per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.**

**15. Se è necessario DNA genomico libero da RNA, aggiungere 2 µl di RNasi A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 16. Far raffreddare il campione a temperatura ambiente prima di aggiungere RNasi A.**

**16. Trasferire con cautela 220 µl del lisato in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIAasymphony SP.**

**Nota:** Se i lisati contengono materiale non digerito, centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente prima di trasferire il supernatante nelle provette per campioni. Per un elenco completo delle provette per campioni compatibili, visitare il sito [www.qiagen.com/goto/dsphanbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphanbooks). Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt, cat. n. 72.693 o 72.608).

**Nota:** I protocolli per tessuto FFPE sono studiati appositamente per eseguire esclusivamente la copurificazione di ridotte quantità di RNA. Ciò comporta un valore di misurazione fotometrico ridotto rispetto ai valori ottenuti con il kit manuale per tessuto FFPE QIAamp DSP DNA.

## Cellule in coltura e batteri

Saranno presto disponibili protocolli di pretrattamento per cellule in coltura, batteri gram-negativi e gram-positivi.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale del kit QIAGEN specifico. I manuali QIAGEN possono essere richiesti al servizio di assistenza tecnica QIAGEN o al distributore locale QIAGEN. Manuali specifici possono essere scaricati dal sito [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature). Le schede di sicurezza (MSDS) relative ad un qualsiasi prodotto QIAGEN possono essere scaricate dal sito [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx).

Marchi commerciali: QIAGEN®, QIASymphony® (Gruppo QIAGEN). I marchi, nomi registrati, ecc., utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge.

© 2012 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ 1-800-243-800

**Austria** ■ 0800/281010

**Belgium** ■ 0800-79612

**Canada** ■ 800-572-9613

**China** ■ 021-51345678

**Denmark** ■ 80-885945

**Finland** ■ 0800-914416

**France** ■ 01-60-920-930

**Germany** ■ 02103-29-12000

**Hong Kong** ■ 800 933 965

**Ireland** ■ 1800 555 049

**Italy** ■ 800 787980

**Japan** ■ 03-5547-0811

**Korea (South)** ■ 1544 7145

**Luxembourg** ■ 8002 2076

**The Netherlands** ■ 0800 0229592

**Norway** ■ 800-18859

**Singapore** ■ 65-67775366

**Spain** ■ 91-630-7050

**Sweden** ■ 020-790282

**Switzerland** ■ 055-254-22-11

**UK** ■ 01293-422-911

**USA** ■ 800-426-8157



---

**Sample & Assay Technologies**