

Febbraio 2017

Manuale del kit QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue



Versione 1

IVD

Per uso diagnostico in vitro

CE

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
GERMANIA

R3 **MAT**

1062689IT



Sommario

Usò previsto	5
Riassunto e spiegazione	5
Principio della procedura	6
Materiale fornito.....	8
Contenuto del kit	8
Materiali necessari ma non in dotazione	9
Avvertenze e precauzioni	10
Conservazione e manipolazione dei reagenti	11
Conservazione e manipolazione dei campioni.....	12
Procedura	13
Preparazione dei tamponi	14
Materiale di partenza	15
Procedura di manipolazione per evitare la contaminazione crociata	16
Centrifugazione	17
Trattamento delle colonne QIAamp MinElute in una microcentrifuga.....	17
Eluizione del DNA purificato	18
Protocollo: Isolamento del DNA genomico da sezioni di tessuto FFPE.....	19
Controllo di qualità	23
Limitazioni	23
Caratteristiche prestazionali.....	24
Simboli.....	24
Informazioni di contatto.....	25
Informazioni per gli ordini	26

Uso previsto

Il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione di DNA genomico da campioni biologici fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).

Il prodotto è destinato all'uso da parte di operatori professionali, quali tecnici o medici, che hanno ricevuto una formazione nelle tecniche di biologia molecolare per scopi di diagnostica in vitro (IVD); è destinato a scopi di preparazione manuale dei campioni e non fornisce alcun risultato clinico, qualitativo o quantitativo.

Riassunto e spiegazione

Il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue è utilizzato per la purificazione di DNA da sezioni di tessuto FFPE. Utilizza la comprovata tecnologia QIAamp DNA Micro per la purificazione di DNA genomico e mitocondriale da campioni di piccoli volumi o ridotte dimensioni. Il kit combina le proprietà di legame selettivo della membrana a base di silice con volumi di eluizione flessibili.

Le condizioni di lisi consentono di purificare efficacemente il DNA genomico dalle sezioni di tessuto FFPE senza il bisogno di sottoporli a incubazione per una notte. L'incubazione a temperatura elevata dopo la digestione mediante proteinasi K rimuove parzialmente il legame della formalina con il DNA rilasciato, migliorando potenzialmente la resa e le prestazioni del DNA nelle analisi a valle. Si osservi che il DNA isolato da campioni FFPE ha generalmente un peso molecolare inferiore rispetto al DNA proveniente da campioni freschi o congelati. Il grado di frammentazione dipende da tipo ed età del campione e dalle condizioni utilizzate per la fissazione.

Dopo la lisi del campione, la semplice procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue è indicata per il trattamento simultaneo di più campioni.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno degli studi di valutazione delle prestazioni di QIAGEN descritti nel manuale.

Principio della procedura

La procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue è costituita da sei fasi (Figura 1):

- Rimozione della paraffina: la paraffina viene disciolta in xilene e rimossa
- Lisi: il campione viene lisato a 56°C in condizioni di denaturazione con proteinasi K
- Riscaldamento: l'incubazione a 90°C inverte i legami crociati della formalina
- Legame: il DNA si lega alla membrana e i contaminanti la attraversano
- Lavaggio: i contaminanti residui vengono rimossi mediante lavaggio
- Eluizione: il DNA puro concentrato viene eluito dalla membrana

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



Figura 1. Procedura QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Materiale fornito

Contenuto del kit

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
N° di catalogo			60404
N° di reazioni			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Colonne QIAamp MinElute con provette di lavaggio)	COL	50
WT	Wash Tubes (Provette di lavaggio) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Tampone di lisi dei tessuti)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (Tampone di lisi)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Tampone di lavaggio 1) (concentrato)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Tampone di lavaggio 2) (concentrato)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer† (Tampone di eluizione)	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (proteinasi K)	PROTK	1,25 ml
-	Instructions For Use (manuale, in inglese)	HB	1

* Contiene sale di guanidina. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Vedere pagina 10 per le avvertenze e le precauzioni.

† Contiene sodio azide come conservante.

Materiali necessari ma non in dotazione

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di dati di sicurezza (safety data sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Reagenti

- Xilene
- Etanolo (96-100%) *

Materiali di consumo

- Se si decide di non utilizzare le provette fornite nel kit, si raccomanda di utilizzare provette per microcentrifuga da 1,5 ml o 2 ml (per le fasi di lisi) e provette per microcentrifuga da 1,5 ml (per le fasi di eluizione) (disponibili presso Eppendorf® [Chiusura di sicurezza: n° cat. 022363204, US; n° cat. 0030 120.086, Europa], oppure Sarstedt [n° 72.690]). Si raccomanda l'utilizzo di provette prive di DNasi/RNasi, di forma conica e con coperchi di sicurezza.
- Pipette e relativi puntali (per impedire la contaminazione crociata, si raccomanda fortemente di utilizzare puntali con barriere anti-aerosol)

Attrezzatura

- ThermoMixer†, incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, blocco riscaldante o bagno termico che consenta l'incubazione a 56°C, 70°C e 90°C
- Microcentrifuga† con rotore per provette da 2 ml
- Agitatore vortex

* Non utilizzare alcol denaturato, che contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

† Nelle procedure QIAamp DSP DNA FFPE, per garantire che i campioni siano trattati nel modo corretto, si consiglia fortemente di calibrare gli strumenti secondo le raccomandazioni del fabbricante.

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di dati di sicurezza (SDS). Le schede, nel pratico e compatto formato PDF, sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN® e relativi componenti.



ATTENZIONE: NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.

Il tampone AL e il tampone AW1 contengono guanidina cloridrato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina.

In caso di fuoriuscita di un liquido contenente questi tamponi, pulire con acqua e un detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire l'area interessata prima con acqua e un detergente da laboratorio, quindi con ipoclorito di sodio 1% (v/v).

Le seguenti informazioni sui rischi e le misure precauzionali si applicano ai componenti del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Tampone AL



Contiene: guanidina cloridrato; acido maleico. Attenzione! Può essere nocivo se ingerito o inalato. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Può provocare una reazione allergica cutanea. Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. **IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE:** lavare abbondantemente con acqua e sapone. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

Tampone ATL



Attenzione! Provoca lieve irritazione cutanea. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.

Tampone AW1



Contiene guanidina cloridrato. Attenzione! Nocivo se ingerito o inalato. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Smaltire il prodotto / recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti approvato. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Indossare guanti / indumenti protettivi / Proteggere gli occhi / il viso.

Proteinasi K



Contiene: Proteinasi K. Pericolo! Provoca lieve irritazione cutanea. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol. Smaltire il prodotto / recipiente in un impianto di smaltimento rifiuti approvato. In caso di sintomi respiratori: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **IN CASO DI INALAZIONE:** Se la respirazione è difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Utilizzare un apparecchio respiratorio.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Le colonne QIAamp MinElute devono essere conservate a 2-8°C al momento della consegna e possono essere utilizzate fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15-25°C) e sono stabili fino alla data di scadenza del kit. Tuttavia, i tamponi ricostituiti AW1 e AW2 possono essere conservati a temperatura ambiente (15-25°C) per un massimo di 1 anno o fino alla data di scadenza del kit, se precedente.

Il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue contiene una soluzione di proteinasi K pronta all'uso, che è fornita in un tampone di conservazione specialmente formulato. La proteinasi K è stabile fino alla data di scadenza del kit se conservata a temperatura ambiente (15-25°C).

Conservazione e manipolazione dei campioni

Le procedure standard di fissazione in formalina e inclusione in paraffina devono essere utilizzate per limitare il livello di frammentazione del DNA. Assicurarsi di applicare le seguenti procedure.

- Fissare i campioni di tessuti in formalina secondo il protocollo di laboratorio (normalmente si considera accettabile 10% di formalina tamponata neutra) il più rapidamente possibile dopo la rimozione chirurgica.
- Usare un tempo di fissazione di 14-24 ore. Limitare i tempi di fissazione in quanto la fissazione prolungata (per esempio >24 ore) può aggravare la frammentazione del DNA, dando come risultato cattive prestazioni nelle analisi a valle).
- Disidratare accuratamente i campioni prima dell'inclusione (la formalina residua può inibire la digestione mediante proteinasi K).

Il DNA viene eluito in tampone ATE ed è immediatamente pronto per l'uso in reazioni di amplificazione o per la conservazione (in condizioni che dipendono dai requisiti dell'utente). Per le condizioni di conservazione raccomandate per specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit pertinenti.

Procedura

Punti importanti prima di iniziare

- Tutti i reagenti forniti nel kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue sono destinati esclusivamente all'uso con gli altri reagenti del medesimo kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Se si desidera mantenere un livello di prestazioni ottimale, non sostituire nessuno dei reagenti del kit.
- Dopo la ricezione, verificare che i componenti del kit non siano danneggiati. Se le confezioni o i flaconi di tampone sono danneggiati, rivolgersi al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale. In caso di fuoriuscita di liquidi, fare riferimento a "Avvertenze e precauzioni", pagina 10). Non utilizzare componenti del kit danneggiati, poiché potrebbero limitare il rendimento del kit.
- Non utilizzare contemporaneamente componenti di più kit per la stessa procedura, a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto nelle pratiche di laboratorio per la diagnostica in vitro.
- Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni per evitare la contaminazione dovuta alla superficie della pelle o alla polvere presente sulle apparecchiature di laboratorio. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono comuni fonti di contaminazione. Cambiare spesso i guanti e tenere chiuse le provette.
- I tamponi inutilizzati, i flow-through e i residui di campione devono essere smaltiti secondo le procedure locali.
- Se si utilizza materiale proprio in plastica, si raccomanda l'uso di provette coniche monouso in polipropilene, a basso legame, prive di DNasi/RNasi, da 1,5-2 ml, dotate di coperchi di sicurezza durante l'intera procedura di purificazione.
- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione a temperatura ambiente (15-25°C).

- Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15-25°C) e devono essere mescolati accuratamente prima dell'uso.
- Impostare un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato a 56°C per utilizzarlo nella fase 11. Se non si ha a disposizione un termomiscelatore o un incubatore ad agitazione orbitale riscaldato, è possibile utilizzare in alternativa un blocco riscaldante o un bagno termico.
- Se il tampone AL o il tampone ATL contengono del precipitato, scioglierlo riscaldandoli a 70°C e agitando delicatamente.
- Assicurarsi che il tampone AW1 e il tampone AW2 siano stati preparati secondo le istruzioni riportate di seguito.
- Le procedure di controllo di qualità di QIAGEN comprendono l'esecuzione di test funzionali sul rilascio dei kit condotti sui singoli lotti di kit. Pertanto, non miscelare reagenti appartenenti a lotti di kit diversi e non unire singoli reagenti provenienti da lotti di reagenti diversi.

Preparazione dei tamponi

Preparazione del tampone ATL

- Prima di iniziare la procedura, verificare se nel tampone ATL si è formato del precipitato. Se necessario, scioglierlo riscaldando il tampone a 70°C e agitandolo delicatamente.

Preparazione del tampone AL

- Prima di iniziare la procedura, verificare se nel tampone AL si è formato del precipitato. Se necessario, scioglierlo riscaldando il tampone a 70°C e agitandolo delicatamente.

Preparazione del tampone AW1

- Aggiungere 25 ml di etanolo (96-100%) al flacone contenente 19 ml di tampone AW1 concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Il tampone AW1 ricostituito può essere conservato a temperatura ambiente (15-25°C) per un massimo di 1 anno o fino alla data di scadenza del kit, se precedente. Si raccomanda di annotare la data di ricostituzione sull'etichetta del tampone.

Nota: prima di iniziare la procedura, mescolare il tampone AW1 ricostituito scuotendolo.

Preparazione del tampone AW2

- Aggiungere 30 ml di etanolo (96-100%) al flacone contenente 13 ml di tampone AW2 concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo. Il tampone AW2 ricostituito può essere conservato a temperatura ambiente (15-25°C) per un massimo di 1 anno o fino alla data di scadenza del kit, se precedente. Si raccomanda di annotare la data di ricostituzione sull'etichetta del tampone.

Nota: prima di iniziare la procedura, mescolare il tampone AW2 ricostituito scuotendolo.

Materiale di partenza

Il materiale di partenza per la purificazione del DNA è costituito da sezioni di tessuto FFPE (idealmente appena recise). È possibile combinare più sezioni di tessuti in un'unica preparazione. Se non si possiedono informazioni sulla natura del materiale di partenza, si consiglia di iniziare con non più di tre sezioni per preparazione.

L'utente deve ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per ogni procedura utilizzata nel proprio laboratorio. Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione QIAGEN a valle, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni.

Procedura di manipolazione per evitare la contaminazione crociata

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, per evitare la contaminazione crociata tra i campioni, è necessario osservare le precauzioni per la manipolazione delle colonne QIAamp MinElute riportate di seguito.

- Non riempire eccessivamente le provette con i tessuti.
- Quando si raschiano i tessuti, cambiare il bisturi tra un campione e l'altro.
- Applicare con cura il campione o la soluzione alla colonna QIAamp MinElute. Trasferire con una pipetta il campione nella colonna QIAamp MinElute senza bagnare il bordo della colonna.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Si raccomanda di utilizzare puntali dotati di barriere anti-aerosol.
- Nelle fasi di lavaggio del campione, utilizzare sempre nuove provette di lavaggio.
- Assicurarsi che i coperchi delle provette siano perfettamente chiusi prima di sottoporle alla miscelazione con agitatore Vortex o alla centrifugazione.
- Assicurarsi che la colonna QIAamp MinElute sia chiusa perfettamente prima di centrifugare.
- Dopo tutte le fasi di centrifugazione a impulsi con agitatore Vortex e le fasi di incubazione a 90°C, centrifugare brevemente le provette per microcentrifuga per eliminare le gocce dall'interno dei coperchi.
- Aprire una sola colonna QIAamp MinElute per volta facendo attenzione a non generare aerosol.
- Cambiare sempre il bisturi tra un campione e l'altro.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Per minimizzare il rischio di contaminazione crociata, si consiglia di utilizzare puntali per pipette con barriere anti-aerosol e di evitare l'utilizzo di pipette multistep.
- Utilizzare sempre guanti monouso e controllare regolarmente che non siano stati contaminati da materiale proveniente dai campioni. Se si sospetta che i guanti siano stati contaminati, gettarli.
- Aprire soltanto una provetta alla volta.

Centrifugazione

Le colonne QIAamp MinElute possono essere inserite nella maggior parte delle provette per microcentrifuga standard da 1,5-2 ml. Provette di lavaggio aggiuntive da 2 ml sono disponibili separatamente (QIAGEN, n° cat. 19201). La centrifugazione delle colonne QIAamp MinElute viene eseguita a circa 6000 x g per ridurre la rumorosità. La centrifugazione a massima velocità non migliora la resa del DNA. Tuttavia, la centrifugazione delle colonne QIAamp MinElute a massima velocità è richiesta in due fasi della procedura: la fase di centrifugazione a secco dopo il lavaggio delle membrane e la fase di eluizione. La centrifugazione alla massima velocità è richiesta inoltre per far scendere il campione dalle pareti dopo la fase del trattamento con xilene e del lavaggio con etanolo.

Tutte le fasi di centrifugazione devono essere effettuate a temperatura ambiente (15–25°C). Una bassa temperatura di centrifugazione può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale.

Trattamento delle colonne QIAamp MinElute in una microcentrifuga

- Chiudere sempre le colonne QIAamp MinElute prima di collocarle nella microcentrifuga.
- Evitare di toccare la membrana della colonna QIAamp MinElute con il puntale della pipetta.
- Le frazioni di flow-through possono contenere residui pericolosi e devono essere smaltite in modo adeguato.
- Per trattare in modo efficiente più campioni in parallelo, si consiglia di riempire un rack con provette di lavaggio in cui poter trasferire le colonne QIAamp MinElute dopo la centrifugazione. Le provette di lavaggio usate contenenti il flow-through possono essere gettate e le nuove, contenenti le colonne QIAamp MinElute, collocate direttamente nella microcentrifuga.
- Prestare attenzione a mantenere sempre la tracciabilità dei campioni durante l'intero processo.

Eluizione del DNA purificato

Per le applicazioni a valle che richiedono piccoli volumi di partenza (per esempio alcune analisi PCR), un eluato più concentrato può migliorare la sensibilità dell'analisi ma può altresì comportare un aumento della concentrazione di potenziali inibitori.

Un aumento del volume di eluizione comporta la diminuzione della concentrazione del DNA nell'eluato.

Il volume di eluato recuperato può essere inferiore di circa 5 µl rispetto al volume del tampone ATE applicato alla colonna QIAamp MinElute. Per esempio, da un volume di eluizione di 20 µl si ottiene un volume ≥ 15 µl di eluato. Il volume dell'eluato ottenuto dipende dalla natura del campione.

È responsabilità dell'utente ottimizzare il volume di eluizione per qualsiasi procedura utilizzata nel proprio laboratorio. Per i volumi di eluizione raccomandati per specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit.

La resa può essere aumentata se la colonna è incubata con il tampone ATE a temperatura ambiente per esempio per un tempo di 5 minuti prima della centrifugazione. Il DNA eluito può essere raccolto in provette di eluizione da 1,5 ml (in dotazione). Le condizioni di conservazione per il DNA eluito dipendono dai requisiti definiti dall'utente. Per le condizioni di conservazione raccomandate per specifiche applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento ai manuali dei kit.

Protocollo: Isolamento del DNA genomico da sezioni di tessuto FFPE

Procedura

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocchetto del campione.
2. Praticare delle sezioni attenendosi alle procedure standard di laboratorio (vedere "Materiale di partenza", pagina 15). L'utente deve ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per ogni procedura utilizzata nel proprio laboratorio. Prestare attenzione a mantenere sempre la tracciabilità dei campioni durante l'intero processo.
3. Raschiare immediatamente il tessuto dalle sezioni utilizzando un bisturi sterile in una provetta di lisi (in dotazione). Assicurarsi che tutto il tessuto disponibile sia stato inserito nella provetta. Aggiungere al campione 1 ml di xilene, chiudere il coperchio e miscelare vigorosamente con agitatore Vortex fino a dissoluzione della paraffina (ad es. 10 s). Assicurarsi che la provetta sia perfettamente chiusa per evitare fuoriuscite di xilene, contaminazione crociata tra i campioni e l'eventuale contatto con lo xilene.
Nota: utilizzare lo xilene in una cappa di aspirazione o altro apparato di contenimento opportuno.
4. Centrifugare alla massima velocità per circa 2 min a temperatura ambiente per raccogliere il pellet di tessuto. Se non si è formato alcun pellet di tessuto, ripetere questa fase.
Nota: una bassa temperatura di centrifugazione può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale.
5. Rimuovere il surnatante mediante una pipetta e gettarlo. Conservare il pellet.
Il surnatante contiene xilene, che è un rifiuto pericoloso e deve essere opportunamente smaltito secondo le normative locali.

6. Aggiungere 1 ml di etanolo (96-100%) al pellet e miscelare accuratamente mediante agitatore Vortex.
L'etanolo estrae lo xilene residuo dal campione e deve essere smaltito in modo opportuno.
7. Centrifugare alla massima velocità per circa 2 min a temperatura ambiente.
Rimuovere il surnatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.
Rimuovere con cautela l'etanolo residuo con un puntale per pipetta sottile. Aprire la provetta e incubare a 15-40°C finché tutto l'etanolo residuo non è evaporato. La rimozione dell'etanolo residuo è fondamentale per la riuscita dell'estrazione.
Nota: una temperatura di incubazione più bassa rallenta l'evaporazione, mentre una temperatura più alta può seccare eccessivamente il pellet rendendone difficile la sospensione.
8. Risospendere il pellet in 180 µl di tampone ATL. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare mediante agitatore Vortex.
Nota: il pellet deve essere rimesso opportunamente in sospensione nel tampone ALT per garantire la massima resa nel recupero.
9. Incubare a 56°C ± 3°C per circa 1 ora (oppure finché il campione non è completamente lisato).
10. Incubare a 90°C ± 5°C per 1 ora ± 5 min.
L'incubazione a 90°C in tampone ATL inverte parzialmente la modifica degli acidi nucleici da parte del formaldeide. Minori tempi di incubazione o temperature di incubazione inferiori possono avere effetti sulla qualità e la quantità 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.
11. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.

12. Aggiungere 200 µl di tampone AL al campione e mescolare accuratamente mediante agitatore Vortex. Quindi aggiungere 200 µl di etanolo (96-100%) e mescolare di nuovo accuratamente mediante agitatore Vortex.

È essenziale che il campione, il tampone AL e l'etanolo vengano miscelati immediatamente e accuratamente mediante agitatore Vortex o utilizzando una pipetta per ottenere una soluzione omogenea. Il tampone AL e l'etanolo possono essere premiscelati e quindi aggiunti insieme in un'unica fase per risparmiare tempo quando si trattano più campioni. Al momento dell'aggiunta del tampone AL e dell'etanolo può formarsi un precipitato di colore bianco. Questo precipitato non interferisce con la procedura QIAamp. Utilizzare sempre una miscela appena preparata e gettarla immediatamente dopo l'uso.

13. Centrifugare brevemente la provetta per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.

14. Trasferire con attenzione l'intero lisato nella colonna QIAamp MinElute (in una provetta di lavaggio da 2 ml) senza bagnare il bordo, chiudere il coperchio e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo ≥ 1 min. Collocare la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml (in dotazione) e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through.

Se il lisato non è ancora passato completamente attraverso la membrana dopo la centrifugazione, centrifugare di nuovo a velocità più elevata fino a che la colonna QIAamp MinElute non sia vuota.

15. Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 µl di tampone AW1 ricostituito senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo ≥ 1 min. Collocare la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through.

16. Aprire con cautela la colonna QIAamp MinElute e aggiungere 500 µl di tampone AW2 ricostituito senza bagnare il bordo. Chiudere il coperchio e centrifugare a circa 6000 x g per un tempo ≥ 1 min. Collocare la colonna QIAamp MinElute in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through.

Occorre evitare che la colonna QIAamp MinElute e il flow-through entrino in contatto. Assicurarsi di bilanciare il rotore della centrifuga. Alcuni rotori di centrifuga possono vibrare in fase di decelerazione, facendo sì che il flow-through, contenente etanolo, entri in contatto con la colonna QIAamp MinElute. Quando si rimuovono la colonna QIAamp MinElute e la provetta di lavaggio dal rotore, prestare attenzione che il flow-through non entri in contatto con la colonna QIAamp MinElute.

17. Centrifugare alla velocità massima (circa 20.000 x g) per circa 3 min per asciugare la membrana.

Il carry-over di etanolo nell'eluato può interferire con le applicazioni a valle.

18. Inserire la colonna QIAamp MinElute in una provetta di eluizione pulita (in dotazione) da 1,5 ml e gettare la provetta di lavaggio contenente il flow-through. Aprire con cautela il coperchio della colonna QIAamp MinElute e aggiungere 20-200 µl di tampone ATE nel centro della membrana.

IMPORTANTE: Se si utilizzano piccoli volumi di eluizione (<50 µl), applicare il tampone ATE nel centro della membrana per garantire l'eluizione completa del DNA legato. Le colonne QIAamp MinElute offrono flessibilità nella scelta del volume di eluizione. Scegliere il volume sulla base dei requisiti dell'applicazione a valle. Il volume di eluato è inferiore di circa 5 µl rispetto al volume della soluzione di eluizione applicata alla colonna.

19. Chiudere il coperchio e incubare a temperatura ambiente (15-25°C) per almeno 1 min. Centrifugare alla massima velocità (circa 20.000 x g) per un tempo ≥1 min.

L'incubazione della colonna QIAamp MinElute, caricata con il tampone ATE, per circa 5 min a temperatura ambiente prima della centrifugazione può aumentare la resa del DNA.

Controllo di qualità

In conformità al Sistema di gestione della qualità certificato da ISO di QIAGEN, ogni lotto di kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue viene testato rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Le prestazioni del kit sono state stabilite utilizzando tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (tessuti FFPE) per l'isolamento del DNA genomico.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno degli studi di valutazione delle prestazioni di QIAGEN descritti nel manuale.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni a valle. Per un'ulteriore convalida, si consiglia di attenersi alle linee guida della International Conference on Harmonization of Technical Requirements (Conferenza Internazionale sull'Armonizzazione dei Requisiti Tecnici (ICH)) riportate in ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Convalida dei metodi analitici: testo e metodologia).

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Quando si utilizza il kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue, può accadere che del RNA, se presente nel campione, venga purificato congiuntamente al DNA.

Caratteristiche prestazionali

Consultare la pagina www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE per informazioni riguardo le caratteristiche prestazionali del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.











Simboli

I seguenti simboli potrebbero comparire sulle confezioni e sulle etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto sufficiente per <N> reazioni
	Utilizzare entro
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Al momento della consegna
	Numero di catalogo
	Codice del lotto
	Numero di materiale
	Componenti
	Contenuto
	Numero

Simbolo

Definizione del simbolo

	Annotare la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone
	Etanolo
	Aggiunta
	Guanidina cloridrato
	Acido maleico
	Codice GTIN
	Limiti di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione

Informazioni di contatto

Per l'assistenza tecnica e per ulteriori informazioni, visitare il sito del nostro servizio di assistenza tecnica www.qiagen.com/Support, chiamare lo 00800-22-44-6000 o contattare uno dei reparti del servizio tecnico QIAGEN o il distributore locale (vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N° cat.
Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (per la purificazione del DNA genomico da tessuti inclusi in paraffina)		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Per 50 preparazioni di DNA: 50 colonne QIAamp MinElute®, proteinasasi K, tamponi, provette di lavaggio (2 ml), provette di eluizione (1,5 ml), provette di lisi (2 ml)	60404

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], MinElute[®] (QIAGEN Group); Eppendorf[®] (Eppendorf AG).

Contratto di licenza limitato per il manuale del kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non garantisce in alcun modo che non violino i diritti di terze parti.
2. Al di là delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo pannello e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN, esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Febbraio 2017 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com