

Aralık 2017

# QIAsymphony® SP Protokol Sayfası

Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP ve Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

Bu belge, QIAsymphony DSP DNA Mini Kit, versiyon 1 için Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP ve Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP  
QIAsymphony SP Protokol Sayfası, R3'tür.

## Genel bilgiler

QIASymphony DSP DNA Kitinin in vitro diagnostik kullanım için olması amaçlanmıştır.

Bu protokoller, QIASymphony SP ve QIASymphony DSP DNA Mini Kit kullanarak dokulardan ve formalinle fikse edilmiş, parafine gömülmüş (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) dokulardan total DNA saflaştırılması içindir.

Örnek tipine bağlı olarak düşük içerikli (low content, LC) veya yüksek içerikli (high content, HC) protokolün kullanılmasını öneriyoruz. Dokular yüksek içerikli protokolle işlendiklerinde daha yüksek DNA verimi elde edilir ancak yüksek DNA konsantrasyonu gerekmesi durumunda küçük bir elüsyon hacmi (50 µl) ile birlikte düşük içerikli protokol kullanılabilir. FFPE dokular için düşük içerikli protokol kullanılmasını öneririz.

### Düşük içerikli protokol

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kiti (kat. no. 937236)
<b>Örnek materyali</b>	FFPE doku ve doku* Her biri 10 µm'ye kadar kalınlığa sahip olan 4 adede kadar FFPE doku kesiti veya 5 µm'ye kadar kalınlığa ve 250 mm <sup>2</sup> 'ye kadar alana sahip olan 8 adet kesit tek bir preparatta birleştirilebilir.
<b>Protokol adı</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Varsayılan Analiz Kontrol Seti</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Elüsyon hacmi</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl veya 400 µl
<b>Gereken yazılım versiyonu</b>	Versiyon 4.0 veya üstü

\* Doku örnekleri hakkında bilgi için yüksek içerikli protokole bakın.

### Yüksek içerikli protokol

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kiti (kat. no. 937236)
<b>Örnek materyali</b>	Doku Beklenen verim hakkında bilgi mevcut değilse 25 mg örnek materyali ile başlanmasını öneririz. Elde edilen verime bağlı olarak, örnek boyutu sonraki preparatlarda artırılabilir.
<b>Protokol adı</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Varsayılan Analiz Kontrol Seti</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Elüsyon hacmi</b>	100 µl, 200 µl veya 400 µl
<b>Gereken yazılım versiyonu</b>	Versiyon 4.0 veya üstü

## Gereken ama sağlanmayan malzemeler

Tüm örnek tipleri için

- Tampon ATL, 4 x 50 ml (kat. no. 939016)
- RNA içeriğini en aza indirmek için: DNase içermeyen RNase A (100 mg/ml stok solüsyonu)

FFPE doku için (ksilensiz deparafinizasyon)

- Deparafinizasyon Çözeltisi (kat. no. 939018)

FFPE doku için (ksilen kullanılan deparafinizasyon)

- Ksilen (%99–100)
- Etanol (%96–100)\*

## "Sample" (Örnek) çekmecesi

<b>Örnek tipi</b>	FFPE doku ve doku
<b>Örnek girdisi hacmi</b>	220 µl (her bir protokolda örnek başına gereken) <sup>†</sup>
<b>İşlenen örnek hacmi</b>	200 µl
<b>Primer örnek tüpleri</b>	n/a
<b>Sekonder örnek tüpleri</b>	Daha fazla bilgi için bkz. <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
<b>İnsertler</b>	Kullanılan örnek tüpünün tipine bağlıdır; daha fazla bilgi için bkz. <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

<sup>†</sup> Hem yüksek, hem de düşük protokollerde örnek transferi sıvı seviyesi saptaması olmadan yapıldığı için örnek hacminin 220 µl'den düşük olması halinde sistem bunu saptamayacaktır. Dolayısıyla örnek girdi hacminin 220 µl olduğundan emin olun.

n/a = uygulanamaz.

## "Reagents and Consumables" (Reaktifler ve Sarf Malzemeleri) çekmecesi

<b>Pozisyon A1 ve/veya A2</b>	Reaktif kartuşu
<b>Pozisyon B1</b>	n/a
<b>Uç askı tutucu 1–17</b>	Tek kullanımlık filtre uçları, 200 µl veya 1500 µl
<b>Ünite kutusu tutucu 1–4</b>	Örnek hazırlama kartuşları veya 8 Rod Kılıfları içeren ünite kutuları

n/a = uygulanamaz.

\* Metanol veya metiletilketon gibi ek kimyasal maddeleri içeren denatüre alkol kullanmayın.

## "Waste" (Atık) çekmecesi

Ünite kutusu tutucu 1-4	Boş ünite kutuları
Atık torbası tutucu	Atık torbası
Sıvı atık şişesi tutucu	Boş sıvı atık şişesi

## "Eluate" (Elüat) çekmecesi

Elüsyon askısı (yuva 1, soğutma pozisyonu kullanıldığını öneririz)	Daha fazla bilgi için bkz. <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
--	---

## Gerekli plastik gereçler

Plastik gereçler	Bir grup, 24 örnek*	İki grup, 48 örnek*	Üç grup, 72 örnek*	Dört grup, 96 örnek*
Tek kullanımlık filtre uçları, 200 µl <sup>†</sup>	26	50	74	98
Tek kullanımlık filtre uçları, 1500 µl <sup>†</sup>	72	136	200	264
Örnek hazırlama kartuşları <sup>§</sup>	21	42	63	84
8-Rod Kılıfları <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Grup başına 24'ten az örnek kullanılması çalışma başına gereken tek kullanımlık filtre ucu sayısını azaltır.

† Filtre ucu askısı başına 32 filtre ucu vardır.

‡ Gereken filtre ucu sayısına reaktif kartuşu başına 1 envanter taraması için filtre uçları dahildir.

§ Ünite kutusu başına 28 örnek hazırlama kartuşu vardır.

¶ Ünite kutusu başına on iki 8 Rod Kılıfı vardır.

**Not:** Verilen filtre ucu sayısı ayarlara bağlı olarak dokunmalı ekranda gösterilen rakamlardan farklı olabilir. Maksimum olası uç sayısının yüklenmesini öneririz.

## Elüsyon hacmi

Elüsyon hacmi dokunmalı ekranda seçilir. Örnek tipine ve DNA içeriğine bağlı olarak son elüat hacmi hacimden 15 µl'ye kadar daha az olabilir. Elüat hacminin değişebileceği gerçeğinden dolayı, aktarma öncesinde elüat hacmini doğrulamayan bir otomatik Tahlil Ayar Sistemi kullanılırken fiili elüat hacminin kontrol edilmesini öneririz. Daha düşük hacimlerde elüsyon son DNA konsantrasyonunu artırır ancak verimi biraz düşürür. İstenen aşağı akışlı uygulama için uygun bir elüsyon hacmi kullanılmasını öneririz.

## Örnek materyalinin hazırlanması

Kimyasallar ile çalışırken, her zaman uygun laboratuvar önlüğü, tek kullanımlık eldiven ve koruyucu gözlük kullanın. Daha fazla bilgi için ürün tedarikçisinden elde edilebilecek uygun güvenlik veri sayfalarına (safety data sheets, SDS'ler) başvurun.

### Başlamadan önce önemli nokta

- QIASymphony manyetik parçacıkları, ikisinin de örnekte bulunması durumunda RNA'yı ve DNA'yı kopürifiye eder. Örnekteki RNA içeriğini en aza indirmek için, ilgili ön muamele protokolünde belirtilen adımda örneğe RNase A ekleyin.

### Başlamadan önce yapılacaklar

- Tampon ATL'yi beyaz çökelti açısından kontrol edin. Gerekliyse çökeltiyi çözdürmek için 37°C'de ara sıra çalkalayarak 30 dakika inkübe edin.
- Bir ThermoMixer® ürününü veya sallayıcı-inkübatörü ilgili ön muamele için gerekli sıcaklığa ayarlayın.\*

### Dokular

DNA saflaştırma işlemi için taze veya donmuş doku kullanılabilir. DNA verimi ve kalitesi doku tipi, kaynağı ve depolama koşullarına bağlı olacaktır. Taze doku, işleme öncesinde parçalara bölünerek -20°C veya -80°C'de depolanabilir. Genel olarak daha yüksek DNA verimi sağlayacak olan yüksek içerikli protokolün kullanılmasını öneririz. Düşük içerikli protokol 50 µl elüsyon hacmiyle birlikte yalnızca aşağı doğru analiz için yüksek DNA konsantrasyonları gerekmesi durumunda önerilir. Beklenen verim hakkında bilgi mevcut değilse 25 mg örnek materyali ile yüksek içerikli protokol ve 200 µl elüsyon hacmi kullanılarak başlanmasını öneririz. Elde edilen verime bağlı olarak, sonraki preparatlarda örnek boyutu artırılabilir veya elüsyon hacmi azaltılabilir. Preparatlara küçük elüsyon hacimleriyle birlikte aşırı yük uygulanmasının elüata manyetik parçacık geçmesiyle sonuçlanabileceğini ve bunun DNA saflığını ve aşağı doğru analizi tehlikeye atabileceğini unutmayın.

\* Aletlerin üreticinin talimatına göre düzenli olarak kontrol edildiğinden, bakımının yapıldığından ve kalibre edildiğinden emin olun.

## Doku için ön muamele protokolü

1. Doku örneğini 2 ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne (birlikte verilmez) aktarın.
2. 220 µl Tampon ATL ekleyin.
3. 20 µl proteinaz K ekleyin ve tüpe hafifçe vurarak karıştırın.  
**Not:** QIASymphony DSP DNA Mini Kit'in enzim askısından proteinaz K kullanın.
4. Tüpü bir ThermoMixer'a veya sallayıcı-inkübatöre yerleştirin ve 900 rpm'de sallayarak doku tamamen çözünene dek 56°C'de inkübe edin.  
**Not:** Lizis süresi işlenen dokunun tipine göre değişir. Birçok doku için lizis 3 saat içinde tamamlanır. Lizisin 3 saat sonra çözülmeyen materyaller veya yüksek derecede visköz lizatların varlığıyla gözükken şekilde tamamlanmamış olması durumunda lizis süresi uzatılabilir veya çözülmeyen materyal adım 6'da açıklanan santrifüjleme işlemiyle giderilebilir. Gece boyunca lizis de mümkündür ve preparatı etkilemez.
5. Örnekteki RNA içeriğini en aza indirmek için 4 µl RNase A (100 mg/ml) ekleyin ve adım 6 ile devam etmeden önce oda sıcaklığında (15–25°C) 2 dakika inkübe edin.
6. Birkaç defa aşağı ve yukarı pipetleme yaparak örneği homojenize edin.  
**Not:** Hala çözülmemiş materyal parçaları varsa 1 dakika boyunca 3000 x g'de santrifüjleme yapın.
7. Üst fazdan 220 µl'lik bir miktarı QIASymphony SP örnek taşıyıcısı ile uyumlu örnek tüplerine dikkatlice aktarın.  
Uyumlu örnek tüplerinin tam bir listesi için bkz. [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). 2 ml'lik tüpler kullanılmasını öneririz (örneğin Sarstedt® kat. no. 72.693 veya 72.608).

## FFPE doku

Standart formalinle fikse etme ve parafine gömme prosedürleri daima nükleik asitlerin önemli derecede fragmentasyonu ile sonuçlanır. DNA fragmentasyonu derecesini sınırlamak için şunları yaptığınızdan emin olun:

- Doku örneklerini cerrahi alımdan sonra mümkün olan en kısa sürede %4–10 formalinle fikse edin
- 14-24 saatlik fiksasyon süresi kullanın (daha uzun fiksasyon süreleri daha şiddetli DNA fragmentasyonuna yol açarak, aşağı doğru testlerde yetersiz performans neden olur)
- Gömme işleminden önce örnekleri iyice kurutun (kalıntı formalin, proteinaz K sindirimini inhibe edebilir)

DNA saflaştırma için başlangıç materyali taze kesilmiş FFPE doku kesitleri olmalıdır. Her biri 10 µm'ye kadar kalınlığa sahip olan 4 adede kadar kesit veya 5 µm'ye kadar kalınlığa ve 250 mm<sup>2</sup>'ye kadar alana sahip olan 8 adet kesit tek bir preparatta işlenebilir. Başlangıç materyalinizin niteliği hakkında bilgi yoksa tek bir preparatta en fazla 3 kesit ile başlanmasını öneririz. DNA verimine ve saflığına bağlı olarak daha sonraki preparatlarda 8 adede kadar kesit kullanılması mümkün olabilir.

**Not:** FFPE doku protokolleri yalnızca düşük miktarlarda RNA kopürifiye etmek için özel olarak tasarlanmıştır. Bu, manuel QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue kit ile elde edilen değerlere göre daha düşük fotometrik ölçüm değerine yol açacaktır.

### FFPE doku için ön muamele protokolü

#### Yöntem 1: Deparafinizasyon Çözeltisi ile deparafinizasyon

1. Bistüri kullanarak fazlalık parafini örnek blokundan kazıyın.
2. 10 µm kalınlığında 4 adede kadar kesit veya 5 µm kalınlığında 8 adede kadar kesit kesin.  
**Not:** Örnek yüzeyi havaya maruz kalırsa ilk 2-3 kesiti atın.
3. Kesitleri hemen QIASymphony SP'nin örnek taşıyıcısıyla uyumlu olan 2 ml'lik bir Sarstedt tüpe (birlikte sağlanmaz, kat no. 72.693 veya 72.608) yerleştirin.
4. Kesitlere 200 µl Tampon ATL ekleyin.
5. 20 µl proteinaz K ekleyin.  
**Not:** QIASymphony DSP DNA Mini Kit'in enzim askısından proteinaz K kullanın.
6. 160 µl veya 320 µl Deparafinizasyon Çözeltisi (bkz. aşağıdaki tablo) ekleyin ve vorteksleyerek karıştırın.

Kesit kalınlığı	Kesit sayısı	Deparafinizasyon çözeltisi hacmi
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Tüpü bir ThermoMixer'a veya sallayıcı-inkübatöre yerleştirin ve 1000 rpm'de sallayarak doku tamamen çözünene dek 56°C'de 1 saat inkübe edin.  
**Not:** Lizis süresi işlenen dokunun tipine göre değişir. Birçok doku için lizis 1 saat içinde tamamlanır. Lizisin 1 saat sonra çözülmeyen materyallerin varlığıyla gözükken şekilde tamamlanmamış olması durumunda lizis süresi uzatılabilir veya çözülmeyen materyal adım 10'da açıklanan santrifüjleme işlemiyle pelletlenebilir. Gece boyunca lizis de mümkündür ve preparatı etkilemez.

8. 1 saat boyunca 90°C'de inkübe edin.  
**Not:** 90°C'de ATL Tamponu içinde inkübasyon, nükleik asitlerin formaldehit modifikasyonunu kısmen tersine çevirir. Daha uzun inkübasyon süreleri veya daha yüksek inkübasyon sıcaklıkları, daha fazla parçalanmış DNA'ya yol açabilir. Yalnızca bir adet ısıtma bloku kullanılıyorsa 56°C'lik inkübasyondan sonra, ısıtma bloku 90°C'ye ulaşana kadar örneği oda sıcaklığında bırakın.
9. Örnekteki RNA içeriğini en aza indirmek için alt faza 2 µl RNase A (100 mg/ml) ekleyin ve adım 10 ile devam etmeden önce oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin. RNase A'yı eklemeyen önce örneğin oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.
10. Oda sıcaklığında 1 dakika tam hızda santrifüjleyin.
11. Tüpleri (her iki fazı da içerenler) dikkatlice QIASymphony SP'nin örnek taşıyıcısına aktarın.

## Yöntem 2: Ksilen ile deparafinizasyon

1. Bistüri kullanarak fazlalık parafini örnek blokundan kazıyın.
2. 10 µm kalınlığında 4 adede kadar kesit veya 5 µm kalınlığında 8 adede kadar kesit kesin.  
**Not:** Örnek yüzeyi havaya maruz kalırsa ilk 2-3 kesiti atın.
3. Kesitleri hemen 1,5 veya 2 ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne (birlikte sağlanmaz) yerleştirin ve örneğe 1 ml ksilen ekleyin. Kapağı kapatın ve 10 saniye kuvvetlice vorteksleyin.
4. Oda sıcaklığında 2 dakika tam hızda santrifüjleyin.
5. Üst fazı pipetleme yoluyla çıkarın. Pelleti çıkarmayın.
6. Pellete 1 ml etanol (%96-100) ekleyin ve vorteksleyerek karıştırın.  
**Not:** Etanol, kalıntı ksileni örnekten ekstre eder.
7. Oda sıcaklığında 2 dakika tam hızda santrifüjleyin.
8. Üst fazı pipetleme yoluyla çıkarın. Pelleti çıkarmayın.  
**Not:** İnce bir pipet ucu kullanarak kalıntı etanolü dikkatle çıkarın.
9. Tüpü açın ve oda sıcaklığında (15–25°C) 10 dakika boyunca veya tüm kalıntı etanol buharlaşana dek inkübe edin.  
**Not:** İnkübasyon 37°C'ye kadar sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir.
10. Pelleti 220 µl ATL Tamponu içinde yeniden süspansiyon haline getirin.
11. 20 µl proteinaz K ekleyin ve vorteksleyerek karıştırın.  
**Not:** QIASymphony DSP DNA Mini Kit'in enzim askısından proteinaz K kullanın.



12. 56°C'de 1 saat (veya örnek tamamen çözünene kadar) inkübe edin.

**Not:** Lizis süresi işlenen dokunun tipine göre değişir. Birçok doku için lizis 1 saat içinde tamamlanır. Lizisin 1 saat sonra çözülmeyen materyallerin varlığıyla gözükken şekilde tamamlanmamış olması durumunda lizis süresi uzatılabilir veya çözülmeyen materyal adım 16'da açıklanan santrifüjleme işlemiyle giderilebilir. Gece boyunca lizis de mümkündür ve preparatı etkilemez.

13. 1 saat boyunca 90°C'de inkübe edin.

**Not:** 90°C'de ATL Tamponu içinde inkübasyon, nükleik asitlerin formaldehit modifikasyonunu kısmen tersine çevirir. Daha uzun inkübasyon süreleri veya daha yüksek inkübasyon sıcaklıkları, daha fazla parçalanmış DNA'ya yol açabilir. Yalnızca bir adet ısıtma bloku kullanılıyorsa 56°C'lik inkübasyondan sonra, ısıtma bloku 90°C'ye ulaşana kadar örneği oda sıcaklığında bırakın.

14. Kapağın içindeki damlaları gidermek için örneği kısa süre santrifüjleyin.

15. Örnekteki RNA içeriğini en aza indirmek için 2 µl RNase A (100 mg/ml) ekleyin ve adım 16 ile devam etmeden önce oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edin. RNase A'yı eklemeyen önce örneğin oda sıcaklığına gelmesini bekleyin.

16. Lizattan 220 µl'lik bir miktarı QIASymphony SP örnek taşıyıcısı ile uyumlu örnek tüplerine dikkatlice aktarın.

**Not:** Lizatların sindirilmemiş materyal içermesi durumunda üst fazı örnek tüplerine aktarmadan önce oda sıcaklığında 2 dakika boyunca tam hızda santrifüjleyin. Uyumlu örnek tüplerinin tam bir listesi için bkz. [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). 2 ml'lik tüpler kullanılmasını öneririz (örneğin Sarstedt, kat. no. 72.693 veya 72.608).

## Revizyon geçmişi

Belge revizyon geçmişi	
R3 12/2017	QIASymphony Yazılımı versiyon 5.0

Güncel lisanslama bilgisi ve ürüne özel ret beyanları için ilgili QIAGEN® kiti el kitabı veya kullanıcı el kitabına bakın. QIAGEN kit el kitapları ve kullanım kılavuzları [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) adresinde bulunabilir veya QIAGEN Technical Services veya yerel distribütörünüzden istenebilir.

Ticari markalar: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Bu belgede geçen kayıtlı isimler, ticari markalar, vb. açıkça bu şekilde belirtilmemiş olsa bile yasalarda korunmaktadır.  
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, tüm hakları saklıdır.

---

Sipariş Verme [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Teknik Destek [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Web Sitesi [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)