

Prestatiekenmerken RNeasy[®] DSP FFPE Kit

Versie 2



Voor in-vitrodiagnostisch gebruik

Voor gebruik in combinatie met de RNeasy DSP FFPE Kit



73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Duitsland

R1

De prestatiekenmerken zijn in elektronische vorm beschikbaar. U kunt deze vinden onder het tabblad 'Resources' (Hulpmiddelen) van de productpagina op www.qiagen.com.

Algemene inleiding

De RNeasy DSP FFPE Kit is bedoeld voor de handmatige zuivering van totaal-RNA uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) weefsels.

Dit product is bedoeld voor professionele gebruikers, zoals analisten en artsen die zijn opgeleid op het gebied van moleculair-biologische technieken. Het maakt gebruik van een geoptimaliseerd silica-protocol gebaseerd op een spinkolom en omvat de enzymatische verwijdering van rest-DNA.

De RNeasy DSP FFPE Kit isoleert RNA-moleculen van langer dan 70 nucleotiden en is in staat om bruikbare RNA-fragmenten te herstellen voor vervolgtoeepassingen zoals RT-PCR.

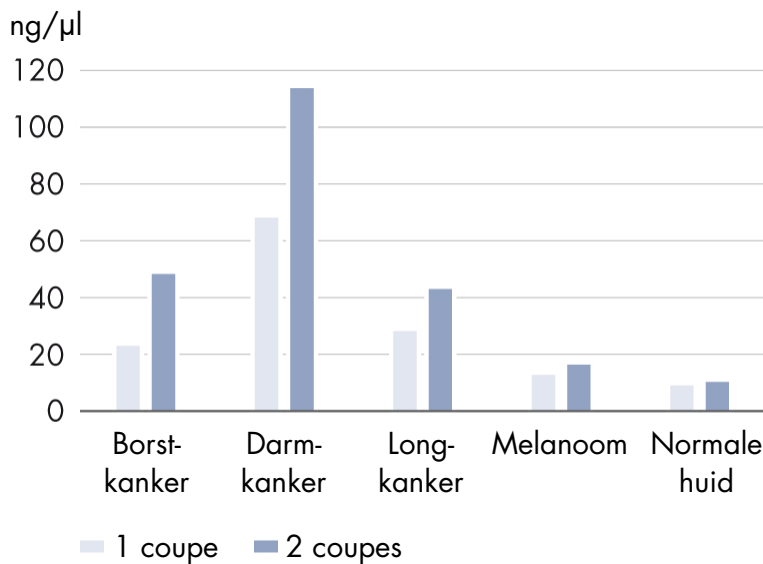
Opbrengst van gezuiverd RNA

De basisprestatie van de RNeasy DSP FFPE Kit werd geëvalueerd met FFPE-monsters van 5 verschillende soorten menselijk weefsel (borst, darm, long, melanoom en normale huid; 20 monsters van elk).

FFPE-monsters kunnen een hoge mate van weefselheterogeniteit vertonen. Bovendien kan het oppervlaktegebied van weefsel per FFPE-monster sterk verschillen, waardoor de hoeveelheid geëxtraheerd RNA kan variëren. Het is daarom aan de gebruiker om het aantal coupes, de dikte van coupes en het oppervlaktegebied van coupes, en alle eventuele andere vervolgpcedures die in het betreffende laboratorium worden gebruikt, voor hun monsters te optimaliseren.

Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN® voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de betreffende handleiding.

Onvoldoende dehydratie tijdens het prepareren van het weefsel door middel van FFPE; te veel paraffine met het weefsel in het extractiebuisje; het gebruik van ethanol met een lagere dan de aanbevolen zuiverheidsgraad (niet voor moleculaire biologie); de aanwezigheid van achtergebleven ethanol in het monster kan leiden tot een suboptimale extractie en een lage hoeveelheid RNA of verminderde vervolprestaties.



Afbeelding 1. RNA-opbrengsten van verschillende menselijke weefsels (32 µl elutievolume).

Vervolganalyse

Geëluëerd RNA is klaar voor gebruik in vervolgassays. Om prestaties te evalueren werd 10 ng RNA van 5 verschillende menselijke weefsels (borst, darm, long, melanoom, en normale huid; 20 monsters bestaande uit één of twee coupes) geïsoleerd met de RNeasy DSP FFPE Kit, en gevalideerd met RT-PCR gericht op het menselijke gen β -actine. Amplificatie was succesvol, en liet zien dat RNA dat was geïsoleerd met de RNeasy DSP FFPE Kit kan worden gebruikt voor vervolganalyse.

De gebruiker dient het aantal coupes, coupedikte en coupe-oppervlak voor het monster in kwestie en eventuele daaropvolgende procedures in hun laboratorium te optimaliseren, of de specifieke prestatie van de relevante vervolgassay te raadplegen.

	Borstkanker	Darmkanker	Longkanker	Melanoom	Normale huid
RT-PCR 1 coupe	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 coupes	✓	✓	✓	✓	✓

Afbeelding 2. Succesvolle RT-PCR-amplificatie van 10 μ m FFPE-coupes afgeleid voor vijf verschillende geteste menselijke weefsels.

Stabiliteit van het eluaat

De stabiliteit van het eluaat is afhankelijk van de samenstelling en het soort verontreinigingen die bij de zuivering zijn meegekomen (hangt samen met het weefseltype), het elutievolume en de opslagomstandigheden. Wij raden gebruikers aan de stabiliteit van het eluaat te bepalen volgens hun specifieke vereisten.

Stabiliteit van het eluaat werd getest voor menselijke RNA-monsters afgeleid van FFPE, die werden bewaard op -15 tot -30 °C en -60 tot -90 °C. Er werd 12 weken geen verslechtering waargenomen en eluaten die werden bewaard op kamertemperatuur (18-25 °C) waren 12 uur lang stabiel. Alle omstandigheden werden beoordeeld aan de hand van RT-PCR gericht op het menselijke gen β -actine.

Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de handleiding van de betreffende kit.

Reproduceerbaarheid

Reproduceerbaarheid werd geëvalueerd met een FFPE-monster van kernhoudende menselijke bloedcellen. De monsters werden getest met een intern gevalideerd assay voor een 295 bp fragment van het menselijke gen β -actine op een ABI® 7900 real-time PCR cyclus.

Voor statistische analyse werden 108 datapunten van drie extractiepartijen (zelfde kitpartij, gebruiker en dag) gebruikt. De statistische analyse omvatte de berekening van de standaardafwijking (SD) en variatiecoëfficiënt (CV) van de C_T -waarden afgeleid van de RT-PCR gericht op β -actine. De SD was 1,1 C_T en de CV was 4,1% (tabel 1).

Tabel 1. Resultaten reproduceerbaarheid

	Reproduceerbaarheid		
	Gemiddelde C _T	SD	CV (%)
Partij 1	26,64	1,01	3,81
Partij 2	27,51	1,16	4,2
Partij 3	27,23	0,95	3,5
Partij 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Reproduceerbaarheid

Reproduceerbaarheid werd uitgevoerd door RNA-extracties van FFPE-monsters van kernhoudende menselijke bloedcellen te beoordelen met verschillende gebruikers, op verschillende dagen en verschillende gebruikers en dagen. De monsters werden getest met een intern gevalideerd assay voor een 295 bp fragment van het menselijke gen β -actine op een ABI 7900 real-time PCR cycler. Voor statistische analyse werden 108 datapunten van drie extractiepartijen gebruikt voor elke testinstelling. De statistische analyse omvatte de berekening van de standaardafwijking (SD) en variatiecoëfficiënt (CV) van de C_T-waarden afgeleid van de RT-PCR gericht op β -actine (tabel 2).

Tabel 2. Resultaten reproduceerbaarheid

	Reproduceerbaarheid		
	Gemiddelde C _T	SD	CV (%)
Verschillende gebruikers	26,92	1,06	3,95
Verschillende dagen	26,56	1,20	4,53
Verschillende gebruikers en dagen	26,63	1,01	3,78

Lineariteit van monsterinvoer

De RNeasy DSP FFPE kit kan worden gebruikt voor het isoleren van RNA uit verschillende FFPE-weefseltypes. Het systeem werd gevalideerd voor het gebruik van 1-4 coupes van FFPE kernhoudende menselijke bloedcellen en toonde een lineaire toename van RNA-opbrengst. Voor de specifieke vereisten van de klant dient een lineair bereik te worden vastgesteld en gevalideerd voor het betreffende gebruik. Voor verschillende weefseltypes is een verschillend lineair bereik te verwachten, afhankelijk van de hoeveelheid gebruikt weefsel in het systeem en de kenmerken van het betreffende weefsel en vervolgasays.

Interfererende stoffen

Uit verschillende bronnen kunnen stoffen afkomstig zijn die interfererend kunnen werken. Voorbeelden hiervan zijn natuurlijke omzettingsproducten die specifiek zijn voor het weefseltype en het orgaan, omzettingsproducten die geproduceerd worden onder pathologische omstandigheden, stoffen die tijdens de behandeling van de patiënt worden geïntroduceerd, of stoffen die door de patiënt zijn ingeslikt. Vanwege de complexiteit van stoffen die interfererend kunnen werken en verschillen in de gevoeligheid van specifieke vervolprocessen en -procedures, raden wij gebruikers aan het effect van interfererende stoffen voor hun eigen systemen te bepalen en de methode om verstoring tegen te gaan in hun specifieke diagnostische vervolprocedure te valideren.

Interfererende stoffen afgeleid van componenten van de RNeasy DSP FFPE Kit tijdens monsterverwerking en RNA-extractie zijn niet geanalyseerd.



















Raadpleeg de handleidingen van de betreffende kits voor specifieke QIAGEN-vervolprocedures voor meer informatie over interfererende stoffen.

Kruisbesmetting

Om de mate van kruisbesmetting te beoordelen, werd 500 ng totaal-RNA uit bloed toegevoegd aan de deparaffinisatieoplossing en geïsoleerd nabij buisjes die geen RNA bevatten (negatieve extractiebuisjes). In dit onderzoek werd geprobeerd een situatie na te bootsen waarin monsters met veel RNA-doelmoleculen via kruisbesmetting andere monsters in dezelfde extractieprocedure kunnen verontreinigen. Met één partij reagentia werd RNA-zuivering uitgevoerd. Kruisbesmetting werd beoordeeld aan de hand van RT-PCR gericht op het menselijke gen β -actine. Uit de resultaten bleek dat er binnen het gehele systeem geen kruisbesmetting was opgetreden.

Symbolen

De volgende symbolen worden in de gebruiksaanwijzing of op de verpakking en etiketten weergegeven:

Symbool	Symbooldefinitie
	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Dit product voldoet aan de vereisten van de Europese regelgeving 2017/746 inzake in-vitrodiagnostische medische hulpmiddelen.
	In-vitrodiagnostisch medisch hulpmiddel
	Bij aankomst
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer (m.b.t. labeling van componenten)
	Componenten (d.w.z. een lijst met wat in de verpakking zit)
	Bevat (inhoud)
	Aantal (m.b.t. flacons, flessen)
	Global Trade Item Number (Artikelnummer wereldhandel)
Rn	'R' staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing (Handleiding); 'n' is het revisienummer
	Temperatuurbepierking
	Fabrikant
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Voorzichtig

Symbool

Symbooldefinitie

PROTK	Proteinase K (Proteinase K)
Sodium azide	Natriumazide
UDI	Uniek hulpmiddel-identificatienummer

Revisiegeschiedenis van document

Revisie

Beschrijving

R1, juni 2022

IVDR-uitgave

Raadpleeg de handleiding of gebruiksaanwijzing van de betreffende QIAGEN-kit voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules. Handleidingen en gebruiksaanwijzingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische diensten van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, RNeasy® (QIAGEN Group); ABI® (Life Technologies Corporation). Gedeponeerde namen, handelsmerken enz. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als niet wettelijk beschermd.

06/2022 HB-3027-D01-001 © 2022 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

