

Bruksanvisning (håndbok) for QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit



Versjon 2

IVD

Til in vitro-diagnostisk bruk
Til bruk med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit



Katalognummer

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, TYSKLAND

R2 **MAT**

1130780NB

Innhold

Tiltent bruk	4
Tiltent bruker.....	4
Beskrivelse og prinsipp.....	5
Oppsummering og forklaring	5
Prinsippene for prosedyren	5
Materialer som følger med.....	7
Settets innhold.....	7
Komponenter i settet	8
Nødvendige materialer som ikke følger med.....	9
Ekstra reagenser.....	9
Forbruksartikler	9
Utstyr	9
Advarsler og forholdsregler.....	10
Sikkerhetsinformasjon	10
Nødinformasjon	11
Forsiktighetsregler.....	11
Avfallshåndtering	12
Håndtering og oppbevaring av reagenser	13
Stabilitet under bruk.....	13
Oppbevaring og håndtering av prøver.....	14
Prosedyre	15
Protokoll: Isolering av Genomisk DNA fra FFPE Tissue-seksjoner	21

Kvalitetskontroll	25
Begrensninger	26
Ytelsesegenskaper	27
Feilsøkingsveiledning	28
Symboler	29
Vedlegg: Håndtering.....	32
Bestillingsinformasjon	33
Endringshistorikk for dokument	34

Tiltenkt bruk

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit er et system som bruker en silikamembranteknologi (QIAamp-teknologi) til isolasjon og rensing av genomisk DNA fra formalinfikserte, parafininnstøpte (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) biologiske prøver.

Det er ment for manuell prøveklargjøring og gir ingen testresultater, hverken kvalitative eller kvantitative.

Tiltenkt bruker

Dette produktet skal brukes av fagpersoner, for eksempel teknikere og fysikere som har fått opplæring i molekylærbiologiske teknikker for in vitro-diagnostiske (IVD) prosedyrer.

Beskrivelse og prinsipp

Oppsummering og forklaring

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit brukes til rensing av DNA fra FFPE-vevsseksjoner. Det bruker veletablert QIAamp DNA-mikroteknologi for rensing av genomisk og mitokondrielt DNA fra små prøvevolumer eller -størrelser. Settet kombinerer de selektive bindeegenskapene til en silikabasert membran med fleksible elusjonsvolumer.

Lyseringsbetingelser gjør at genomisk DNA effektivt kan renses fra FFPE-vevsseksjoner uten at inkubasjon over natten er nødvendig. Inkubasjon ved forhøyet temperatur etter fordøyelse av proteinase K fjerner delvis formalin-tverrbinding av det frigjorte DNA, noe som potensielt forbedrer utbyttet, i tillegg til DNA-ytelse i nedstrømsanalyser. Merk at DNA isolert fra FFPE-prøver vanligvis har lavere molekylvekt enn DNA fra ferske eller frosne prøver. Graden av fragmentering er avhengig av type og alder på prøven og betingelsene som brukes for fiksering.

Etter prøvelysering er den enkle QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit-prosedyren egnet for simultan behandling av flere prøver.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGEN[®]s ytelsesundersøkelser beskrevet i håndboken.

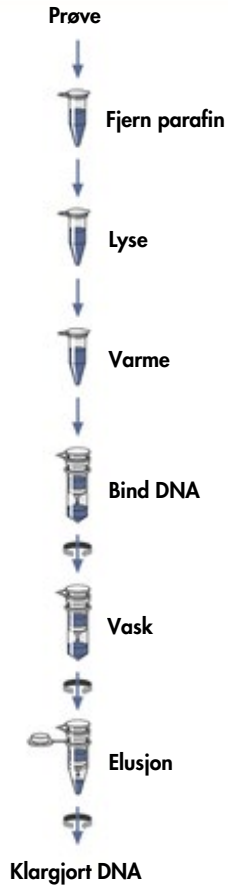
Prinsippene for prosedyren

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits prosedyre består av 6 trinn (Figur 1):

- Fjerning av parafin: Parafin oppløses i xylene og fjernes.
- Lysering: Prøven lyseres ved 56 °C under denaturerende forhold med Proteinase K.
- Varme: Inkubasjon ved 90 °C reverserer formalin-tverrbinding.

- Binding: DNA binder seg til membranen og kontaminant strømmet gjennom.
- Vask: Gjenværende kontaminanter blir vasket bort.
- Elusjon: Rent, konsentrert DNA elueres fra membranen.

Prosedyre for QIAamp DSP DNA FFPE Tissue


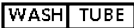




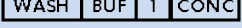
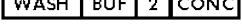
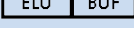




Figur 1. Prosedyre for QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Materialer som følger med

Settets innhold

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit	(50)
Katalognr.	60404
Antall klargjøringer	50

	ID	Symboler	Antall
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute-kolonner med vaskerør)		50
WT	Wash Tubes (Vaskerør) (2 ml)		3 x 50
ET	Elution Tubes (Elusjonsrør) (1,5 ml)		50
LT	Lysis Tubes (Lyseringsrør) (2 ml)		50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Lyseringsbuffer for vev)		10 ml
AL	Lysis Buffer* (Lyseringsbuffer)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Vaskebuffer 1) (konsentrat)		19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Vaskebuffer 2) (konsentrat)		13 ml
ATE	Elution Buffer† (elusjonsbuffer)		12 ml
PK	Proteinase K		1,25 ml
–	Håndbok (engelsk)		1

* Inneholder et guanadinsalt. Ikke kompatibel med desinfeksjonsmidler som inneholder blekemiddel. Se side 10 for Advarsler og forholdsregler.

† Inneholder natriumazid som konserveringsmiddel.

Komponenter i settet

Settets hovedkomponenter blir beskrevet nedenfor.

Tabell 1. Aktive bestanddeler i medfølgende reagenser

Reagens		Aktiv(e) bestanddel(er)	Konsentrasjon (v/v) [%]
Symbol	Navn		
ATL	Buffer ATL	Natriumdodecylsulfat	≥1 til <10
AL	Buffer AL	Guanidinhydroklorid Maleinsyre	>30 til <50 ≥0.1 til <1
AW1	Buffer AW1	Guanidinhydroklorid Etanol	≥50 til <70 ≥10 til <90
AW2	Buffer AW2	Etanol	≥10 til <90
ATE	Buffer ATE	Ingen	–
PK	Proteinase K	Proteinase K	≥1 til <10

For å redusere risikoen for negativ innvirkning på diagnostiske resultater som er generert etter DNA-isolering skal det brukes egnede kontroller for nedstrømsapplikasjoner.

Nødvendige materialer som ikke følger med

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. For mer informasjon, se de relevante sikkerhetsdatabladene (Safety Data Sheet, SDS) som kan fås hos leverandøren av produktet.

Ekstra reagenser

- Xylene
- Etanol (96–100 %)*

Forbruksartikler

- Hvis det tas en beslutning om å ikke bruke rørene som følger med i settet, anbefaler vi 1,5 eller 2 ml mikrosentrifugerør (for lysringstrinn) og 1,5 ml mikrosentrifugerør (for elusjonstrinn) (f.eks. tilgjengelig fra Sarstedt®, kat.nr. 72.690). Vi anbefaler DNase/RNase-frie, koniske rør med sikre lokk. Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for andre prosedyrer som brukes i laboratoriet, og som ikke dekkes av QIAGEN-undersøkelser av ytelse.
- Pipetter og pipettespisser (for å unngå krysskontaminering anbefaler vi på det sterkeste pipettespisser med aerosolbarrierer)

Utstyr†

- Termomikser‡, oppvarmet orbital inkubator, varmeblokk eller vannbad egnet til inkubering ved 56 °C, 70 °C og 90 °C
- Mikrosentrifuge† med rotor for 2 ml rør
- Vorteksblender

* Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer, som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

† Før bruk må du forsikre deg om at instrumentene er kontrollert og kalibrert i henhold til produsentens anbefalinger.

‡ For å sikre at prøvene behandles tilstrekkelig i QIAamp DSP DNA FFPE-prosedyrene, anbefaler vi på det sterkeste at instrumenter kalibreres i henhold til produsentenes anbefalinger.

Advarsler og forholdsregler

Basert på QIAGENS risikostyring ble alle tiltenkte risikokontrolltiltak implementert i produktdesignet. Den totale gjenværende risikoen anses som akseptabel og bruken av enheten vurderes som trygg. Denne håndboken inneholder instruksjoner, advarsler og forholdsregler for å sikre enhetens sikkerhet og ytelse. De må følges til punkt og prikke.

Vær oppmerksom på at alvorlige hendelser i forbindelse med bruken av utstyret muligens må rapporteres til produsenten og/eller deres autoriserte representant og den ansvarlige myndigheten i det landet hvor brukeren og/eller pasienten befinner seg.

Sikkerhetsinformasjon

Bruk alltid egnet laboratoriefrakk, engangshansker og vernebriller ved arbeid med kjemikalier. Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige i praktisk og kompakt PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan søke etter, vise og skrive ut sikkerhetsdatabladet for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

FORSIKTIG IKKE tilsett blekemidler eller sure løsninger direkte i prøveklargjøringsavfallet.



- Buffer AL og Buffer AW1 inneholder guanidinhydroklorid som kan danne sterkt reaktive forbindelser når det kombineres med blekemiddel.
- Dersom væske som inneholder disse bufferne blir sølt ut, rengjør med egnet laboratorievaskemiddel og vann. Dersom den spilte væsken inneholder potensielt smittsomme stoffer, rengjør det berørte området først med laboratorievaskemiddel og vann, og deretter med 1 % (v/v) natriumhypoklorittløsning.
- Prøvene er potensielt smittefarlige. Kast prøve- og analyseavfall i henhold til lokale sikkerhetsprosedyrer.

Nødinformatjon

CHEMTREC

USA og Canada 1-800-424-9300

Utenfor USA og Canada +1 703-527-3887

Forsiktighetsregler

Buffer AL



Inneholder: guanidinhydroklorid og maleinsyre. Advarsel! Kan være skadelig ved svelging eller innånding. Irriterer huden. Forårsaker alvorlig øyeirritasjon. Kan utløse en allergisk hudreaksjon. Hvis øyeirritasjon vedvarer: Søk legehjelp. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. VED HUDKONTAKT: Vask med mye såpe og vann. Hvis det oppstår hudirritasjon: Søk legehjelp. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

Buffer ATL



Advarsel! Forårsaker mild hudirritasjon. Hvis det oppstår hudirritasjon: Søk legehjelp.

Buffer AW1



Inneholder: guanidinhydroklorid. Advarsel! Farlig ved svelging eller innånding. Irriterer huden. Forårsaker alvorlig øyeirritasjon. Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege hvis du føler deg uvel. Innhold/holder leveres til et godkjent avfallsbehandlingssted. Tilsølte klær må fjernes og vaskes før de brukes på nytt. Benytt vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.

Proteinase K



Inneholder: Proteinase K. Fare! Forårsaker mild hudirritasjon. Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding. Unngå innånding av støv/røyk/gass/ tåke/damp/aerosoler. Innhold/holder leveres til et godkjent avfallsbehandlingssted. Ved symptomer i lufteiene: Ta kontakt med GIFTINFORMASJONEN eller lege. VED INNÅNDING: Ved pustevansker, flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende hviler i en stilling som letter åndedrettet. Bruk åndedrettsvern.

Avfallshåndtering

Avfallet inneholder prøver og reagenser. Dette avfallet kan inneholde giftig eller smittefarlig materiale, og må avhendes på riktig måte. Se de lokale sikkerhetsforskriftene for riktige prosedyrer for kassering.

Se gjeldende sikkerhetsdatablader (Safety Data Sheets, SDS) hvis du ønsker mer informasjon. Disse er tilgjengelige på nett i PDF-format på www.qiagen.com/safety, der du kan finne, vise og skrive ut sikkerhetsdatablader (SDS) for hvert QIAGEN-sett og hver settkomponent.

Håndtering og oppbevaring av reagenser

QIAamp MinElute columns skal oppbevares ved 2–8 °C ved mottak og kan brukes frem til utløpsdatoen som er angitt på settets eske.

Alle buffere kan oppbevares ved romtemperatur (15–25 °C) og er stabile frem til settets utløpsdato, dersom det er uåpnet.

Stabilitet under bruk

Rekonstituert Buffer AW1 og AW2 kan lagres ved romtemperatur (15–25 °C) i opptil 1 år, eller inntil utløpsdatoen for settet, avhengig av hva som er kortest.

Oppbevaring og håndtering av prøver

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit er utviklet til bruk med FFPE-prøver.

DNA-stabilitet avhenger av ulike faktorer, som prøvetaking, -håndtering, -klargjøring og oppbevaringsbetingelser, som kan påvirke bruken i nedstrømsapplikasjonen. Det er viktig å sjekke bruksanvisningen for den spesifikke nedstrømsapplikasjonen og/eller verifisere og godkjenne hele arbeidsflyten for å etablere egnede betingelser.

Du finner generell informasjon om laboratorieprosedyrer for prøvetaking, -håndtering, -klargjøring og oppbevaringsbetingelser for FFPE-prøver i ISO 20166-3:2018 "Molecular in vitro diagnostic examinations — Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue — Part 3: Isolated DNA" (Molekylære in vitro-diagnostiske undersøkelser – Spesifikasjoner for forundersøkelser for formalinfiksert og parafininnstøpt vev (FFPE-vev) – Del 3: Isolert DNA) og CLSI MM13-A "Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline" (Prøvetaking, -transport, -klargjøring og -oppbevaring for molekylære metoder; godkjent retningslinje).

DNA elueres i Buffer ATE og er umiddelbart klar til bruk i amplifikasjonsreaksjoner eller for lagring (forhold avhengig av brukerkrav). Du finner detaljert informasjon i de relevante setthåndbøkene for anbefalte lagringsforhold for spesifikke QIAGEN nedstrømsapplikasjoner.

Prosedyre

Viktige punkter før du starter

- Alle reagenser som følger med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit-settet skal bare brukes med de andre reagensene i det samme QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit-settet. Reagensene i settet må ikke erstattes med andre produkter dersom optimal ytelse skal opprettholdes.
- Når du har mottatt settet, må du kontrollere om settets komponenter er skadet. Hvis pakningene eller bufferflaskene er skadet, skal du ta kontakt med QIAGENs tekniske serviceavdeling eller din lokale leverandør. Ved væskesøl må du lese «Advarsler og forholdsregler», (side 10). Bruk ikke skadede settkomponenter, fordi bruk av disse kan føre til dårlig ytelse for settet.
- Bruk ikke komponenter fra andre sett med det settet du bruker for øyeblikket, med mindre partinumrene er identiske.
- Unngå mikrobiell kontaminering av settreagensene.
- Dette settet skal kun brukes av personell som er opplært i laboratoriepraksis for in vitro-diagnostikk.
- Bruk alltid lateks- eller vinylhansker ved håndtering av reagenser og prøver for å forhindre kontaminering fra overflaten av huden eller fra støvete laboratorieutstyr. Det er bakterier på hender og støvpartikler, og disse er de vanlige kilder til kontaminering. Bytt hansker ofte og hold rørene lukket.
- Ubrukte buffere, væsker og prøverester skal kastes i henhold til lokale prosedyrer.
- Hvis du bruker dine egne plastvarer, anbefales bruk av DNase/RNase-fri lavbindende, engangs polypropylen 1,5–2 ml koniske rør med sikre lokk under hele renseprosedyren.
- Utfør alle sentrifugeringstrinn ved romtemperatur (15–25 °C).
- Alle buffere skal oppbevares ved romtemperatur (15–25 °C) og de må blandes godt før bruk.

- Still inn en termoblander eller oppvarmet orbital inkubator på 56 °C for bruk i trinn 9. Hvis en termoblander eller oppvarmet orbital inkubator ikke er tilgjengelig, kan du bruke en varmeblokk eller et vannbad i stedet.
- Hvis Buffer AL eller Buffer ATL inneholder presipitat, varmer du dem opp til 70 °C og rister lett for å løse det opp.
- Se til at Buffer AW1 og Buffer AW2 er klargjort i henhold til instruksjonene under.
- Kvalitetskontrollprosedyrer ved QIAGEN bruker funksjonell release-testing av settene for hver enkelt settparti. Derfor må du ikke blande reagenser fra ulike settpartier og ikke kombinere enkeltreagenser fra ulike reagenspartier.

Klargjøring av buffere

Klargjøring av Buffer ATL

- Før du starter prosedyren, må du kontrollere om presipitat er dannet i Buffer ATL. Ved behov, løs opp ved å varme opp til 70 °C med forsiktig rysting.

Klargjøring av Buffer AL

- Før du starter prosedyren, må du kontrollere om presipitat er dannet i Buffer AL. Ved behov, løs opp ved å varme opp til 70 °C med forsiktig rysting.

Klargjøring av Buffer AW1

- Tilsett 25 ml etanol (96–100 %) * i flasken som inneholder 19 ml med konsentrert Buffer AW1. Sjekk avkryssingsruten på merket på flasken for å indikere at det er tilsatt etanol. Rekonstituert Buffer AW1 kan lagres ved romtemperatur (15–25 °C) i opptil 1 år, eller inntil utløpsdatoen for settet, avhengig av hva som er kortest. Vi anbefaler å skrive rekonstitueringsdatoen på etiketten til bufferen.

Merk: Før prosedyren starter, må du blande rekonstituert Buffer AW1 ved å riste den.

Klargjøring av Buffer AW2

- Tilsett 30 ml etanol (96–100 %) i flasken som inneholder 13 ml med konsentrert Buffer AW2. Sjekk avkryssingsruten på merket på flasken for å indikere at det er tilsatt etanol. Rekonstituert Buffer AW2 kan lagres ved romtemperatur (15–25 °C) i opptil 1 år, eller inntil utløpsdatoen på settet, avhengig av hva som er kortest. Vi anbefaler å skrive rekonstitueringsdatoen på etiketten til bufferen.

Merk: Før prosedyren starter, må du blande rekonstituert Buffer AW2 ved å riste den.

Startmateriale

Startmaterialet for DNA-rensing er snitt av FFPE-vev (helst ferskkuttede). Flere snitt kan kombineres i 1 klargjøring. Hvis du ikke har noen informasjon om typen startmateriale, anbefaler vi å starte med ikke mer enn 3 snitt per klargjøring.

* Denaturert alkohol som inneholder andre stoffer, som metanol eller metyletylketon, må ikke brukes.

Brukeren bør optimalisere antall seksjoner, snittykkelse og seksjonsoverflate for alle prosedyrer som brukes i laboratoriet. Hvis settet brukes sammen med en QIAGEN-nedstrømsapplikasjon, se den relevante håndboken for instruksjoner.

Håndtering av prosedyre for å unngå krysskontaminering

På grunn av sensitiviteten til nukleinsyreamplifikasjonsteknologi er det viktig å følge disse forholdsreglene ved håndtering av QIAamp MinElute-kolonner for å unngå krysskontaminering mellom prøver:

- Rørene må ikke overfylles med vev.
- Bytt skalpellene mellom prøvene når du skraper vevet.
- Påfør prøve eller løsningen forsiktig på QIAamp MinElute-kolonnen. Pipetter prøven inn i QIAamp MinElute-kolonnen uten å fukte kanten på kolonnen.
- Skift alltid pipettespisser mellom væskeoverføringer. Vi anbefaler å bruke pipettespisser med aerosolbarrierer.
- Bruk alltid nye vaskerør når du utfører trinn for prøvevask.
- Påse at rørlukkene er helt lukket før virvling og sentrifugering.
- Påse at QIAamp MinElute-kolonnen er helt lukket før sentrifugering.
- Etter alle pulsverteksblandingstrinnene og 90 °C inkubasjonstrinn, skal du sentrifugere mikrosentrifugerørene kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.
- Åpne bare 1 QIAamp MinElute-kolonne om gangen, og vær forsiktig så du unngår å generere aerosoler.
- Bytt alltid skalpellene mellom prøvene.
- Skift alltid pipettespisser mellom væskeoverføringer. For å minimere krysskontaminering anbefaler vi å benytte pipettespisser med aerosolbarrierer og unngå bruk av flertrinns pipetter.
- Bruk alltid engangshansker, og kontroller regelmessig at de kan være kontaminert med prøvemateriale. Kast hanskene hvis du mistenker at de har blitt kontaminert.
- Åpne kun 1 rør om gangen.

Sentrifugering

QIAamp MinElute-kolonner passer til de fleste standard 1,5–2 ml mikrosentrifugerør. Sentrifugeringen av QIAamp MinElute-kolonner utføres ved ca. 6000 x *g* for å redusere sentrifugestøyen. Sentrifugering ved full hastighet will ikke forbedre DNA-utbyttet. Det kreves imidlertid sentrifugering av QIAamp MinElute-kolonner ved full hastighet i 2 trinn av prosedyren: tørrsentrifugeringstrinnet etter at membranene er vasket, og elusjonstrinnet. Sentrifugering ved full hastighet er også nødvendig for å få ned prøven etter xylenbehandlingen og etanolvasketrinnet.

Alle sentrifugeringstrinn skal utføres ved romtemperatur (15–25 °C). Lav sentrifugeringstemperatur kan føre til suboptimal utvinning.

Behandling av QIAamp MinElute-kolonner i en mikrosentrifuge

- Du må alltid lukke QIAamp MinElute-kolonner før du plasserer dem i mikrosentrifugen.
- Unngå at pipettespissen kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnemembranen.
- Væskefraksjoner kan inneholde farlig avfall og skal avhendes på egnet måte.
- For effektiv parallell behandling av flere prøver, anbefaler vi å fylle et stativ med vaskerør som QIAamp MinElute-kolonnene kan overføres til etter sentrifugering. Brukte vaskerør som inneholder væsker kan kastes, og de nye vaskerørene som inneholder QIAamp MinElute-kolonnene kan plasseres direkte i mikrosentrifugen.
- Påse at full prøvesporbarhet opprettholdes under hele prosessen.

Eluere rensset DNA

For downstream-applikasjoner som krever små startvolumer (f.eks. PCR-analyser), kan et mer konsentrert eluat øke analysesensitiviteten, men kan også føre til en økning i konsentrasjonen av potensielle inhibitorer.

En økning i elusjonsvolum vil redusere konsentrasjonen av DNA i eluatet.

Volumet av utvunnet eluat kan være omtrent 5 µl mindre enn volumet til Buffer ATE som påføres QIAamp MinElute-kolonnen. Et elusjonsvolum på 20 µl resulterer for eksempel i ≥15 µl eluat. Eluatvolumet som utvinnes, avhenger av typen prøve.

Det er brukerens ansvar å optimere elusjonsvolumet for andre prosedyrer som brukes i laboratoriet. Du finner detaljert informasjon i setthåndbøkene for anbefalte elusjonsvolum som er påkrevet for spesifikke QIAGEN nedstrømsapplikasjoner.

Utbyttet kan økes hvis kolonnen inkuberes med Buffer ATE ved romtemperatur i for eksempel 5 minutter før sentrifugering. Eluerte DNA kan samles opp i 1,5 ml elusjonsrør (medfølger). Lagringsforholdene for det eluerte DNA-et er avhengig av brukerdefinerte krav. Du finner detaljert informasjon i setthåndbøkene for anbefalte lagringsforhold for spesifikke QIAGEN nedstrømsapplikasjoner.

Protokoll: Isolering av Genomisk DNA fra FFPE Tissue-seksjoner

Prosedyre

1. Trim av overflødig parafin fra prøveblokken med en skalpell.
2. Kutteseksjoner i henhold til standard laboratoriepraksis (se «Startmateriale», side 17). Brukeren bør optimalisere antall seksjoner, snittykkelse og seksjonsoverflate for alle prosedyrer som brukes i laboratoriet. Påse at sporbarheten til prøvene holdes under hele prosedyren.
3. Skrap umiddelbart vevet fra seksjonene med steril skalpell i et lyseringsrør (medfølger). Påse at alt tilgjengelig vev plasseres i røret. Tilsett 1 ml xylen i prøven, lukk lokket og vortex kraftig til parafinen er oppløst (f.eks. 10 sekunder). Sørg for at røret er helt lukket for å unngå xylensøl, krysskontaminering mellom prøvene og mulig kontakt med xylenet. Merk: Bruk xylen i avtrekkshetter eller annet passende innkapslingsutstyr.
4. Sentrifuger ved full hastighet i omtrent 2 minutter ved romtemperatur for å samle inn vevspellet. Gjenta dette trinnet dersom ingen vevspellet ble dannet. Merk: Lav sentrifugeringstemperatur kan føre til suboptimal utvinning.
5. Fjern og kast supernatanten ved å pipettere. Behold pelleten. Supernatant inneholder xylen, som er farlig avfall og skal avhendes på egnet måte i henhold til lokale forskrifter.
6. Tilsett 1 ml etanol (96–100 %) til vevspelleten og bland grundig ved hjelp av vorteksblending. Etanolen ekstraherer resterende xylen fra prøven og skal kasseres på riktig måte.

7. Sentrifuger ved full hastighet i omtrent 2 minutter ved romtemperatur.

Fjern supernatanten forsiktig ved å pipettere. Ikke fjern noe av pelleten.

Fjern forsiktig all resterende etanol ved bruk av en fin pipettespiss. Åpne røret og inkuber ved 15–40 °C til all resterende etanol har fordampet. Fjerning av gjenværende etanol er avgjørende for at utvinning skal være vellykket.

Merk: Lavere inkubasjonstemperatur reduserer fordampningstiden, mens høyere temperatur kan overtørke pelleten og gjøre den vanskelig å suspendere.

8. Resuspender pelleten i 180 µl Buffer ATL. Tilsett 20 µl Proteinase K og bland ved hjelp av vorteksblending.

Merk: Pelletter må resuspenderes godt i ATL-buffere for å sikre maksimal utbytteoppretting.

9. Inkuber ved 56 °C i omtrent 1 time (inntil prøven har blitt fullstendig lysert).

10. Inkuber ved 90 °C i 1 time.

Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvis formaldehydmodifisering av nukleinsyrer. Kortere inkubasjonstider eller lavere inkubasjonstemperaturer kan påvirke DNA-kvalitet og -mengde. Hvis det brukes kun 1 varmeblokk, la prøven stå i romtemperatur etter 56 °C-inkuberingen inntil varmeblokken har nådd 90 °C.

11. Sentrifuger røret kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.

12. Tilsett 200 µl Buffer AL til prøven, og bland godt ved hjelp av vorteksblending. Tilsett deretter 200 µl etanol (96–100 %), og bland godt ved hjelp av vorteksblending.

Det er av avgjørende betydning at prøven, Buffer AL og etanol blandes umiddelbart og grundig ved hjelp av vorteksblending eller pipettering for å gi en homogen løsning. Buffer AL og etanol kan blandes på forhånd og tilsettes sammen i 1 trinn for å spare tid ved behandling av flere prøver. Et hvitt presipitat kan dannes etter tilsetning av Buffer AL og etanol. Dette presipitatet påvirker ikke QIAamp-prosedyren. Bruk alltid fersk blanding og kasser den umiddelbart etter bruk.

13. Sentrifuger røret kort for å fjerne dråper fra innsiden av lokket.

14. Overfør forsiktig hele lysatet til QIAamp MinElute-kolonnen (i et 2 ml vaskerør) uten at kanten blir våt, lukk lokket og sentrifuger ved $6000 \times g$ i ≥ 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør (medfølger), og kast vaskerøret som inneholder gjennomstrømningen.

Hvis lysatet ikke har passert helt gjennom membranet etter sentrifugering, sentrifuger på nytt ved høyere hastighet til QIAamp MinElute-kolonnen er tom.

15. Åpne forsiktig QIAamp MinElute-kolonnen, og tilsett 500 μ l rekonstituert Buffer AW1 uten at kanten blir våt. Lukk lokket og sentrifuger ved $6000 \times g$ i ≥ 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør, og kast vaskerøret som inneholder gjennomstrømningen.
16. Åpne forsiktig QIAamp MinElute-kolonnen, og tilsett 500 μ l rekonstituert Buffer AW2 uten at kanten blir våt. Lukk lokket og sentrifuger ved $6000 \times g$ i ≥ 1 minutt. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 2 ml vaskerør, og kast vaskerøret som inneholder gjennomstrømningen.

Det er viktig å unngå kontakt mellom QIAamp MinElute-kolonnen og gjennomstrømningen. Sørg for å balansere sentrifugerotoren. Noen sentrifugerotorer kan vibrere etter deselerasjon, slik at gjennomstrømningen, som inneholder etanol, kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen. Vær forsiktig når du fjerner QIAamp MinElute-kolonnen og vaskerøret fra rotoren, slik at gjennomstrømningen ikke kommer i kontakt med QIAamp MinElute-kolonnen.

17. Sentrifuger ved full hastighet (omtrent $20\,000 \times g$) i ca. 3 minutter for å tørke membranen.

Etanolmedring til eluatet kan forstyrre noen nedstrøms-applikasjoner.

18. Plasser QIAamp MinElute-kolonnen i et rent 1,5 ml elusjonsrør (medfølger), og kast vaskerøret som inneholder gjennomstrømning. Åpne forsiktig lokket på QIAamp MinElute-kolonnen og påfør 20–200 µl Buffer ATE i midten av membranen.

Viktig: Hvis du bruker små elusjonsvolum (<50 µl), må du dispensere Buffer ATE på midten av membranen for å sikre fullstendig eluering av bundet DNA. QIAamp MinElute-kolonnene gir fleksibilitet i valg av elusjonsvolum. Velg et elusjonsvolum ifølge kravene til downstream-applikasjonen. Volumet av utvunnet eluat vil være omtrent 5 µl mindre enn volumet til elusjonsløsningen som påføres kolonnen.

19. Lukk lokket, og inkuber ved romtemperatur (15–25 °C) i minst 1 minutt. Sentrifuger ved full hastighet (omtrent 20 000 x g) i ≥1 minutt.

Inkubering av QIAamp MinElute-kolonnen lastet med Buffer ATE i omtrent 5 minutter ved romtemperatur før sentrifugering kan øke DNA-utbyttet.

Kvalitetskontroll

I henhold til QIAGENs ISO-sertifiserte kvalitetsstyringssystem, testes hvert parti med QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits mot forhåndsbestemte spesifikasjoner for å sikre konsekvent produktkvalitet.

Begrensninger

Settets ytelse har blitt etablert ved bruk av FFPE-vev til isolering av genomisk DNA.

Under- eller overfiksering kan påvirke DNA-kvalitet og føre til dårlig ytelse i nedstrømsanalyser.

Resterende formalin kan inhibere Proteinase K-nedbrytningstrinnet, så sørg derfor for grundig uttørring av prøver før innstøping.

Det er brukerens ansvar å validere systemets ytelse for eventuelle prosedyrer som brukes i laboratoriet, som ikke dekkes av QIAGENs ytelsesundersøkelser.

For å redusere risikoen for negativ innvirkning på de diagnostiske resultatene skal det brukes egnede kontroller for nedstrømsapplikasjoner. For ytterligere validering anbefales retningslinjene fra ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements) i ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures (Validering av analytiske prosedyrer): Text and Methodology (Tekst og metodologi).

Alle diagnostiske resultater som genereres, må tolkes i sammenheng med andre kliniske funn eller laboratoriefunn.

Ved å bruke QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit kan RNA samrenses med DNA hvis det er til stede i prøven.

Ytelseegenskaper

De gjeldende ytelseegenskapene finner du under fanen for ressurser på produksiden til www.qiagen.com.

Feilsøkingsveiledning

Denne feilsøkingsveiledningen kan være nyttig for å løse problemer som kan oppstå. Hvis du ønsker mer informasjon, kan du også se siden med ofte stilte spørsmål på vårt tekniske supportsenters: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Forskerne ved QIAGENs tekniske serviceavdeling er alltid klare til å besvare eventuelle spørsmål du måtte ha enten om informasjonen og/eller protokollene i denne håndboken eller prøve- og analyseteknologi (for kontaktinformasjon, besøk www.qiagen.com).

Kommentarer og forslag

Tilstoppet QIAamp MinElute-kolonne

- | | |
|--------------------------------------|--|
| a) For mye startmateriale | Reduser mengden av startmateriale. Det er viktig å bruke riktig mengde utgangsmateriale (se side 17). |
| b) Sentrifugeringstemperatur for lav | Sentrifugeringstemperaturen bør være 15–25 °C. Noen sentrifuger kan avkjøles til lavere enn 15 °C selv når de er satt til 20 °C. Dette kan forårsake dannelse av bunnfall som kan tilstoppe QIAamp MinElute-kolonnene. Hvis dette skjer, setter du sentrifugeringstemperaturen til 15–25 °C. |

Lavt DNA-utbytte

- | | |
|--|---|
| a) For mye startmateriale | Overbelastning av QIAamp MinElute-spinnkolonnen reduserer nukleinsyreutbyttet i vesentlig grad. Reduser mengden av startmateriale (se side 17). |
| b) DNA fortsatt bundet til Rneasy MinElute spinnkolonnemembran | Gjenta DNA-elusjon, men inkuber QIAamp MinElute-spinnkolonnen på bordflate i 10 minutter med ATE-buffer (elusjonsbuffer) før sentrifugering. |
| c) Feil lagring av buffer/reagenser | QIAamp MinElute spin columns må lagres ved 2–8 °C ved ankomst av settet. Kontroller riktig lagringstemperatur da eksponering for høyere temperaturer over lengre perioder kan føre til tap av funksjonalitet. |

Lav A_{260}/A_{280} -verdi











- | | |
|---|--|
| Vann brukt til å fortynne nukleinsyre for A_{260}/A_{280} -måling | Bruk 10 mM Tris Cl, pH 7,5, ikke vann, for å fortynne prøven før renheten måles. |
|---|--|







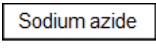



DNA yter ikke bra i nedstrømsanalyser/applikasjoner

- | | |
|-----------------|--|
| Etanolmedriving | Sentrifugering av QIAamp MinElute-kolonner ved full hastighet er nødvendig i 2 trinn av prosedyren: Under den andre vasken med Buffer AW2 må det sentrifugeres ved $\geq 8000 \times g$ i 2 minutter ved 15–25 °C for å tørke QIAamp MinElute-spinnkolonnemembranen. Etter sentrifugering må kolonnen fjernes forsiktig fra prøvetakingsrøret slik at kolonnen ikke kommer i kontakt med væsken. Plasser deretter kolonnen i et nytt prøvetakingsrør, og sentrifuger ved full hastighet i 5 minutter. Sentrifugering ved full hastighet er også nødvendig for å få ned prøven etter xylenbehandlingen og etanolvasketrinnet. |
|-----------------|--|

Symboler

Følgende symboler vises i bruksanvisningen eller på emballasjen og etiketter:

Symbol	Symboldefinisjon
 Σ <N>	Inneholder reagenser som er tilstrekkelig til <N> reaksjoner
	Siste forbruksdato
	Dette produktet oppfyller kravene i den europeiske bestemmelsen 2017/746 for in vitro-diagnostiske medisinske enheter.
	In vitro-diagnostisk medisinsk enhet
	Katalognummer
	Lotnummer
	Materialnummer (dvs. komponentmerking)
	Komponenter
	Inneholder
	Nummer
	Globalt artikkelnummer

Symbol	Symboldefinisjon
Rn	R står for revisjon av bruksanvisningen, og n står for revisjonsnummeret
	Temperaturbegrensning
	Produsent
	Se bruksanvisningen
	Må beskyttes mot sollys
	Advarsel/forsiktig
	Proteinase K
	Natriumazid
	Ved ankomst
	Skriv ned dagens dato etter at du har tilsatt etanol i flasken _____
	Etanol

Symbol

Symboldefinisjon

ADD

Tilsetter

GuHCl

Guanidinhidroklorid

MALEIC ACID

Maleinsyre

UDI

Entydig utstyrsidentifikator

Vedlegg: Håndtering

Generell håndtering

Bruk alltid lateks- eller vinylhansker ved håndtering av reagenser og prøver for å forhindre kontaminering fra overflaten av huden eller fra støvete laboratorieutstyr. Det er bakterier på hender og støvpartikler, og disse er de vanlige kilder til kontaminering. Bytt hansker ofte og hold rørene lukket. Unngå mikrobiell kontaminering av settreagensene.

Plastdeler til engangsbruk

Bruk av sterile polypropylenrør til engangsbruk anbefales gjennom hele prosedyren.

Bestillingsinformasjon

Produkt	Innhold	Kat.nr.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – for rensing av genomisk DNA fra parafininnstøpte vev		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Til 50 DNA-klargjøringer: 50 QIAamp MinElute-kolonner, Proteinase K, Buffere, vaskerør (2 ml), elusjonsrør (1,5 ml), lyseringsrør (2 ml)	60404

For oppdatert lisensinformasjon og produktspesifikke ansvarsfraskrivelser, se bruksanvisningen for det aktuelle QIAGEN-settet. Bruksanvisninger for QIAGEN-sett kan fås på www.qiagen.com eller kan leveres fra QIAGENs tekniske serviceavdeling eller din lokale distributør.

Endringshistorikk for dokument

Revisjon	Beskrivelse
R1, juni 2022	<ul style="list-style-type: none">● Oppdatering til settversjon 2 for samsvar med IVDR● Oppdatering av Beskrivelse og prinsipp avsnitt● Oppdatering av Nødvendige materialer som ikke følger med avsnitt● Oppdatering av Advarsler og forholdsregler avsnitt● Oppdatering av Håndtering og oppbevaring av reagenser avsnitt● Oppdatering av Feilsøkingsveiledning avsnitt● Oppdatering av vedlegget
R2, februar 2023	<ul style="list-style-type: none">● Oppdatering av avsnittet Håndtering og oppbevaring av prøver

Begrenset lisensavtale for QIAamp DSP DNA Kit

Bruk av dette produktet innebærer at enhver kjøper eller bruker av produktet samtykker i følgende vilkår:

1. Produktet kan bare brukes i samsvar med protokollene som leveres med produktet og denne håndboken, og skal bare brukes med komponenter som er inkludert i panelet. QIAGEN gir ingen lisens for noen av sine åndsprodukter til å bruke eller innlemme komponenter i dette panelet med andre komponenter som ikke er inkludert i dette panelet, med unntak av det som er beskrevet i protokollene som leveres med produktet, denne håndboken og andre protokoller som er tilgjengelige på www.qiagen.com. Noen av disse andre protokollene er utarbeidet av QIAGEN-brukere for QIAGEN-brukere. Disse protokollene er ikke blitt grundig testet eller optimalisert av QIAGEN. QIAGEN garanterer ikke for dem og gir heller ingen garanti for at de ikke krenker rettighetene til tredjeparter.
2. QIAGEN gir ingen garanti for at dette panelet og/eller dets bruk ikke krenker rettighetene til tredjeparter, bortsett fra uttrykkelig oppgitte lisenser.
3. Dette panelet og tilhørende komponenter er lisensiert til engangsbruk og kan ikke brukes flere ganger, modifiseres eller selges på nytt.
4. QIAGEN frasier seg spesifikt andre lisenser, uttrykt eller underforstått, bortsett fra de som er uttrykkelig oppgitt.
5. Kjøperen og brukeren av panelet samtykker i at de ikke skal gjøre eller la noen andre gjøre noe som kan resultere i eller fremme handlinger som er forbudt ovenfor. QIAGEN kan håndheve forbud i denne begrensede lisensavtalen i en hvilken som helst domstol, og skal få tilbake alle sine etterforsknings- og domstolskostnader, inkludert advokathonorarer, knyttet til enhver handling som iverksettes for å håndheve denne begrensede lisensavtalen eller eventuelle immaterielle rettigheter forbundet med panelet og/eller komponentene.

Oppdaterte lisensvilkår er tilgjengelige på www.qiagen.com.

Varemerker: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], MinElute[®] (QIAGEN Group); Sarstedt[®] (Sarstedt AG and Co.).

Feb-2023 HB-3033-002 1130780NB © 2023 QIAGEN, med enerett.

