

Augusti 2015

QIASymphony[®] SP-protokollblad

Tissue_LC_200_V7_DSP och
Tissue_HC_200_V7_DSP

Det här dokumentet är *Tissue_LC_200_V7_DSP* och *Tissue_HC_200_V7_DSP* QIASymphony SP-protokollblad, R2, för kitversion 1.

Allmän information

För in vitro-diagnostisk användning.

Dessa protokoll är avsedda för rening av totalt DNA från vävnader och formalinfixerade, paraffinbäddade (FFPE) vävnader med användning av QIASymphony® SP och QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Protokoll för odlade celler och bakterieodlingar är under utveckling och blir snart tillgängliga.

Beroende på provtypen rekommenderar vi användningen av antingen protokollet för lågt innehåll (low content, LC) eller protokollet för högt innehåll (high content, HC). Vävnader ger mer DNA när de bearbetas med protokollet för högt innehåll, men protokollet för lågt innehåll kan användas i kombination med en liten elueringsvolym (50 µl) om det krävs en hög DNA-koncentration. För FFPE-vävnad rekommenderar vi att protokollet för lågt innehåll används.

Protokoll för lågt innehåll

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr 937236)
Provmaterial	FFPE-vävnad och vävnad* Upp till 4 FFPE-vävnadssnitt, vart och ett med en tjocklek på upp till 10 µm, eller 8 snitt med en tjocklek på upp till 5 µm och en yta på upp till 250 mm ² , kan kombineras i ett preparat.
Protokollnamn	Tissue_LC_200_V7_DSP
Standardanalyskontroll	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elueringsvolym	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
Erforderlig programversion	Version 4.0

* Se protokollet för högt innehåll för information om vävnadsprover

Protokollet för högt innehåll

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr 937236)
Provmaterial	Vävnad Om det saknas information om den förväntade mängden DNA rekommenderar vi att du börjar med 25 mg provmaterial. Beroende på hur mycket DNA som erhålls kan provstorleken ökas i påföljande preparat.
Protokollnamn	Tissue_HC_200_V7_DSP
Standardanalyskontroll	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Elueringsvolym	100 µl, 200 µl eller 400 µl
Erforderlig programversion	Version 4.0

Material som behövs men inte medföljer

För alla provtyper

- ATL-buffert, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, kat. nr 939016)
- För att minimera RNA-innehåll: DNase-fritt RNase A (stamlösning på 100 mg/ml)

För FFPE-vävnad (xylenfri avparaffinering)

- Avparaffineringslösning (Deparaffinization Solution, kat. nr 939018)

För FFPE-vävnad (avparaffinering med xylol)

- Xylol (99–100 %)
- Etanol (96–100 %)*

Lådan "Sample" (prov)

Provtyp	FFPE-vävnad och vävnad
Provinmatningsvolym	220 µl (krävs per prov enligt protokollet)*
Bearbetad provvolym	200 µl
Primära provrör	Ej relevant
Sekundära provrör	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks för mer information.
Insatser	Beror på vilken typ av provrör som används, se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks för mer information.

[†] För både protokoll för högt och lågt innehåll kommer systemet inte att känna igen om provvolymen är mindre än 220 µl eftersom provöverföringen genomförs utan avkänning av vätskenivån. Säkerställ därför att provets inmatningsvolym är 220 µl.

n/a = ej relevant.

* Använd inte denaturerad alkohol, som innehåller andra substanser, exempelvis metanol eller metyletylketon.

Lådan "Reagents and Consumables" (reagens och förbrukningsmaterial)

Position A1 och/eller A2	Reagenskasset
Position B1	Ej relevant
Spetsrackhållare 1-17	Engångsfilterspetsar, 200 µl eller 1 500 µl
Hållare för enhetslådor 1-4	Enhetslådor som innehåller provprepareringskassetter eller 8-stavsskydd

n/a = ej relevant.

Lådan "Waste" (avfall)

Hållare för enhetslådor 1-4	Tomma enhetslådor
Hållare för avfallspåse	Avfallspåse
Hållare för avfallsflaska	Tom flaska för flytande avfall

Lådan "Eluate" (eluat)

Elueringsställ (vi rekommenderar att uttag 1, kylpositionen, används)	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks för mer information.
--	--

Erforderliga plastartiklar

plastartiklar	En batch, 24 prover*	Två batcher, 48 prover*	Tre batcher, 72 prover*	Fyra batcher, 96 prover*
Engångs-filterspetsar, 200 µl [†]	26	50	74	98
Engångs-filterspetsar, 1 500 µl [†]	72	136	200	264
Provprepareringskassetter [§]	21	42	63	84
8-stavsskydd [¶]	3	6	9	12

* Om färre än 24 prover per batch används minskas antalet engångsfilterspetsar som krävs per körning.

[†] Det finns 32 filterspetsar/filterspetsställ.

[‡] Antalet filterspetsar som krävs inbegriper filterspetsar för 1 inventerande skanning per reagenskasset.

[§] Det finns 28 provprepareringskassetter/enhetslåda.

[¶] Det finns tolv 8-stavsskydd/enhetslåda.

Obs! Beroende på inställningarna kan antalet givna filterspetsar skilja sig från de siffror som visas på pekskärmen. Vi rekommenderar att det maximala antalet spetsar laddas.

Elueringsvolym

Elueringsvolymen väljs på pekskärmen. Beroende på provtyp och DNA-innehåll kan den slutliga elueringsvolymen variera med upp till 15 µl mindre än den valda volymen. Eftersom elueringsvolymen kan variera rekommenderar vi att du kontrollerar den faktiska elueringsvolymen vid användning av ett automatiserat analysinställningssystem som inte verifierar elueringsvolymen innan överföringen. Eluering i lägre volymer ökar den slutliga DNA-koncentrationen, men reducerar mängden något. Vi rekommenderar att du använder en elueringsvolym som är lämplig för den avsedda nedströmstillämpningen.

Preparering av provmaterial

Mer information finns i tillämpliga säkerhetsdatablad (SDS) som kan erhållas från produktleverantören.

Viktigt att tänka på före start

- QIASymphony-magnetpartiklar renar både RNA och DNA samtidigt om båda finns i provet. För att minimera RNA-innehåll i provet kan du tillsätta RNase A i provet under det steg som anges i respektive förbehandlingsprotokoll.

Saker som bör göras före start

- Kontrollera ATL-buffert avseende vit utfällning. Inkubera vid behov i 30 minuter vid 37 °C med skakning då och då för att lösa upp utfällning.
- Ställ in en termomixer eller skakinkubator på den temperatur som krävs för respektive förbehandling..*

Vävnader

Färsk och fryst vävnad kan användas för DNA-rening. Den erhållna DNA-mängden och -kvaliteten beror på vävnadstyp, vävnadskälla och förvaringsförhållanden. Färsk vävnad kan skäras i små bitar och förvaras vid -20 °C eller -80 °C före bearbetning. I allmänhet rekommenderar vi att du använder protokollet för högt innehåll, vilket ger ökad DNA-mängd. Protokollet för lågt innehåll, i kombination med elueringsvolymen 50 µl, rekommenderas endast om det behövs höga DNA-koncentrationer för nedströmsanalys. Om det saknas information om den förväntade mängden rekommenderar vi att du börjar med 25 mg provmaterial med användning av protokollet för högt

* Förvissa dig om att instrumenten har kontrollerats, underhållits och kalibrerats regelbundet enligt tillverkarens anvisningar.

innehåll och elueringsvolymen på 200 µl. Beroende på mängden som erhålls kan provstorleken ökas eller elueringsvolymen kan minskas i påföljande preparat. Tänk på att en överbelastning av preparat i kombination med små elueringsvolymen kan göra att det sker en överföring av magnetpartiklar till eluatet vilket kan försämra DNA-renhet och nedströmsanalys.

Förbehandlingsprotokoll för vävnad

1. Överför vävnadsprovet till ett 2 ml mikrocentrifugrör (ingår inte).
2. Tillsätt 220 µl ATL-buffert.
3. Tillsätt 20 µl proteinas K och blanda genom att knacka lätt på provröret.
Obs! Använd proteinas K från enzymstället i QIA Symphony DSP DNA Mini Kit.
4. Placera provröret i en ThermoMixer eller skakinkubator och inkubera vid 56 °C med skakning vid 900 rpm tills vävnaden är helt lyserad.
Obs! Lyseringstiden varierar beroende på vävnaden som bearbetas. För de flesta vävnaden är lyseringen klar inom 3 timmar. Om lysering är ofullständig efter 3 timmar, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material eller kraftigt viskösa lysat, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material kan avlägsnas med centrifugering så som beskrivs i steg 6. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.
5. För att minimera RNA-innehåll i provet tillsätter du 4 µl RNase A (100 mg/ml) och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur (15–25 °C) innan du fortsätter med steg 6.
6. Homogenisera provet genom att pipettera upp och ned flera gånger.
Obs! Om det fortfarande finns olösligt material kvar centrifugerar du vid 3000 x g i 1 minut.
7. Överför försiktigt 220 µl supernatant till provrör som är kompatibla med probäraren för QIA Symphony SP.
Det finns en fullständig lista över kompatibla provrör på www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi rekommenderar användning av 2 ml provrör (t.ex. Sarstedt, kat. nr 72.693 eller 72.608).

FFPE-vävnad

Standardprocedurer för formalinfixering och paraffinbäddning leder alltid till betydande fragmentering av nukleinsyror. Begränsa omfattningen av DNA-fragmentering genom att:

- fixera vävnadsprover i 4–10 % formalin snarast möjligt efter kirurgisk provtagning
- använd en fixeringstid på 14–24 timmar (längre fixeringstider leder till allvarligare DNA-fragmentering, vilket ger dålig prestanda vid nedströmsanalyser)

- dehydrera prover noggrant före inbäddning (formalinrester kan hämma proteinas K-digereringen)

Startmaterial för DNA-rening ska vara färska snitt av FFPE-vävnad. Upp till 4 snitt, vart och ett med en tjocklek på upp till 10 µm, eller 8 snitt med en tjocklek på upp till 5 µm och en yta på upp till 250 mm², kan bearbetas i ett preparat. Om du saknar information om startmaterialets egenskaper rekommenderar vi att du börjar med högst 3 snitt i ett preparat. Beroende på DNA-mängd och -renhet, kan det vara möjligt att använda upp till 8 snitt i påföljande preparat.

Obs! FFPE-vävnadsprotokollen är specialutformade för att endast rena små mängder RNA samtidigt. Detta leder till ett lägre fotometrimätvärde jämfört med värden som erhålls med den manuella QIAamp® DSP DNA FFPE-vävnadssetsen.

Förbehandlingsprotokoll för FFPE-vävnad

Metod 1: avparaffinering med avparaffiniseringslösning

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell.
2. Skär av upp till 4 snitt som är 10 µm tjocka eller upp till 8 snitt som är 5 µm tjocka.

Obs! Om provytan har exponerats för luft ska de första 2–3 snitten kasseras.
3. Placera omedelbart snitten i ett 2 ml Sarstedt-rör (ingår inte, kat. nr 72.693 eller 72.608) som är kompatibelt med provbäraren för QIASymphony SP.
4. Tillsätt 200 µl ATL-buffert till snitten.
5. Tillsätt 20 µl proteinas K.

Obs! Använd proteinas K från enzymstället i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Tillsätt 160 µl eller 320 µl avparaffiniseringslösning (se tabell nedan) och vortexblanda.

Snittjocklek	Antal snitt	Mängd avparaffiniseringslösning
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Placera provröret i en termomixer eller skakinkubator och inkubera vid 56 °C i 1 timme med skakning vid 1 000 rpm tills vävnaden är helt lyserad.

Obs! Lyseringstiden varierar beroende på vävnaden som bearbetas. För de flesta vävnader är lyseringen klar inom 1 timme. Om lysering är ofullständig efter 1 timmar, vilket indikeras

genom förekomsten av olösligt material, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material kan pelleras med centrifugering så som beskrivs i steg 10. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.

8. Inkubera vid 90 °C i 1 timme.

Obs! Inkuberingen vid 90 °C i ATL-buffert häver delvis formaldehydmodifieringen av nukleinsyror. Längre inkuberingstider eller högre inkuberingstemperaturer kan leda till ett mer fragmenterat DNA. Om endast ett värmeblock används ska provet stå i rumstemperatur efter inkuberingen vid 56 °C tills värmeblocket är uppe i 90 °C.

9. För att minimera RNA-innehåll i provet tillsätter du 2 µl RNase A (100 mg/ml) i den undre fasen och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur innan du fortsätter med steg 10. Låt provet svalna till rumstemperatur innan RNase A tillsätts.

10. Centrifugera vid full hastighet i 1 minut vid rumstemperatur.

11. Överför försiktigt provrör (innehållande båda faserna) till provbäraren för QIA Symphony SP.

Metod 2: avparaffinisering med xylol

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell.

2. Skär av upp till 4 snitt som är 10 µm tjocka eller upp till 8 snitt som är 5 µm tjocka.

Obs! Om provytan har exponerats för luft ska de första 2–3 snitten kasseras.

3. Placera omedelbart snitten i ett 1,5 eller 2 ml mikrocentrifugrör (ingår inte) och tillsätt 1 ml xylol till provet. Stäng locket och vortexblanda kraftigt i 10 sekunder.

4. Centrifugera vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur.

5. Avlägsna supernatanten genom pipettering. Avlägsna inte något av pelleten.

6. Tillsätt 1 ml etanol (96–100 %) till pelleten och vortexblanda.

Obs! Etanolet extraherar xylolrester från provet.

7. Centrifugera vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur.

8. Avlägsna supernatanten genom pipettering. Avlägsna inte något av pelleten.

Obs! Avlägsna försiktigt etanolrester med en pipett med fin spets.

9. Öppna provröret och inkubera vid rumstemperatur (15–25 °C) i 10 minuter eller tills alla etanolrester har avdunstat.

Obs! Inkubering kan ske vid temperaturer upp till 37 °C.

10. Återsuspendera pelleten i 220 µl ATL-buffert.

11. Tillsätt 20 µl proteinas K och vortexblanda.

Obs! Använd proteinas K från enzymstället i QIA Symphony DSP DNA Mini Kit.

12. Inkubera vid 56 °C i 1 timme (eller tills provet är fullständigt lyserat).

Obs! Lyseringstiden varierar beroende på vävnaden som bearbetas. För de flesta vävnader är lyseringen klar inom 1 timme. Om lysering är ofullständig efter 1 timme, vilket indikeras genom förekomsten av olösligt material, kan lyseringstiden förlängas eller olösligt material kan avlägsnas genom centrifugering så som beskrivs i steg 16. Lysering över natten är möjlig och påverkar inte preparatet.

13. Inkubera vid 90 °C i 1 timme.

Obs! Inkuberingen vid 90 °C i ATL-buffert häver delvis formaldehydmodifieringen av nukleinsyror. Längre inkuberingstider eller högre inkuberingstemperaturer kan leda till ett mer fragmenterat DNA. Om endast ett värmeblock används ska provet stå i rumstemperatur efter inkuberingen vid 56 °C tills värmeblocket är uppe i 90 °C.

14. Centrifugera provet som hastigast för att avlägsna droppar från lockets insida.

15. För att minimera RNA-innehåll i provet tillsätter du 2 µl RNase A (100 mg/ml) och inkuberar i 2 minuter vid rumstemperatur innan du fortsätter med steg 16. Låt provet svalna till rumstemperatur innan RNase A tillsätts.

16. Överför försiktigt 220 µl av lysatet till provrör som är kompatibla med provbäraren för QIASymphony SP.

Obs! Om lysat innehåller ej digererat material centrifugerar du vid full hastighet i 2 minuter vid rumstemperatur innan supernatanten överförs till provrör. Det finns en fullständig lista över kompatibla provrör på www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi rekommenderar användning av 2 ml provrör (t.ex. Sarstedt, kat. nr 72.693 eller 72.608)

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler: se respektive QIAGEN-kithandbok eller användarhandbok. QIAGEN-kithandböcker och användarhandböcker finns att tillgå på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGEN:s tekniska serviceavdelning eller från lokal återförsäljare.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Registrerade namn, varumärken, etc. som används i detta dokument, även om de inte angetts som sådana, ska inte anses som oskyddade i lag. 08/2015 HB-0977-S01-002
© 2012–2015 QIAGEN, med ensamrätt.

