

Brugsanvisning til QIASymphony[®] DSP DNA Mini Kit (protokolark)

Protokollerne Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP

Version 2



Til in vitro-diagnostisk brug

Til brug sammen med QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)



937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1

Protokolarket findes i digitalt format og kan findes på fanen Resource på siden Product på www.qiagen.com.

Generelle oplysninger

QIASymphony DSP DNA Kit er beregnet til in vitro-diagnostisk brug.

Disse protokoller er til oprensning af totalt DNA fra væv og formalinfikseret, paraffinindlejret (FFPE) væv med anvendelse QIASymphony SP og QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Afhængigt af prøvetypen anbefaler vi at anvende enten protokollen for lavt indhold (LC) eller højt indhold (HC). Væv vil give øgede DNA-resultater, når behandlet med protokollen for højt indhold, men protokollen for lavt indhold sammen med en lille elueringsmængde (50 µl) kan anvendes, hvis en høj DNA-koncentration er påkrævet. For FFPE-væv anbefaler vi at anvende protokollen for lavt indhold.

Protokol for lavt indhold

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236)
Prøvemateriale	FFPE-væv og væv* Op til 4 FFPE-vævssektioner, hver med en tykkelse på op til 10 µm eller 8 sektioner med en tykkelse på op til 5 µm og et overfladeareal på op til 250 mm ² , kan kombineres i én prøveklargøring.
Protokolnavn	Tissue_LC_200_V7_DSP
StandardanalysekontROLSÆT	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Elueringsmængde	50 µl, 100 µl, 200 µl eller 400 µl
Påkrævet softwareversion	Version 4.0 eller højere
Nødvendig softwarekonfiguration til IVD-brug	Standardprofil 1

* Se protokollen for højt indhold for information om vævsprøver.

Protokol for højt indhold

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat.-nr. 937236)
Prøvemateriale	Væv Hvis der ikke er information om det forventede resultat tilgængelig, anbefaler vi at starte med 25 mg prøvemateriale. Afhængigt af det opnåede resultat kan prøvestørrelsen øges i efterfølgende prøveklargøringer.
Protokolnavn	Tissue_HC_200_V7_DSP
StandardanalysekontROLSÆT	ACS_TissueHLC_200_V7_DSP
Elueringsmængde	50, 100, 200 eller 400 µl
Påkrævet softwareversion	Version 4.0 eller højere
Nødvendig softwarekonfiguration til IVD-brug	Standardprofil 1

Nødvendige materialer, som ikke medfølger

Til alle prøvetyper

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (kat.-nr. 939016)
- Sådan minimeres RNA-indhold: DNase-fri RNase A (stamopløsning på 100 mg/ml)

Til FFPE-væv (xylenfri deparaffinering)

- Deparaffinization Solution (kat.-nr. 939018)

Til FFPE-væv (deparaffinering vha. xylen)

- Xylen (99-100 %)
- Ethanol (96-100 %)*

Skuffen "Sample" (prøve)

Prøvetype	FFPE-væv og væv
Prøvevolumen	220 µl (påkrævet pr. prøve, pr. protokol)*
Behandlet prøvemængde	200 µl
Primære prøverør	i/r
Sekundære prøverør	Vedr. yderligere information henvises til listen over laboratorieartikler på fanen Resource på siden Product på www.qiagen.com .
Indsatser	Vedr. yderligere information henvises til listen over laboratorieartikler på fanen Resource på siden Product på www.qiagen.com .

* For både protokoller med højt og lavt indhold vil systemet ikke registrere, hvis prøvevolumenet er mindre end 220 µl, fordi prøveoverførsel udføres uden detektion af væskenniveau. Derfor skal det sikres, at prøveinputvolumen er 220 µl.

i/r = ikke relevant.

Skuffen "Reagents and Consumables" (Reagenser og forbrugsartikler)

Position A1 og/eller A2	Reagenspatron (RC)
Position B1	i/r
Spidsrackholder 1-17	Engangsfilterspidser, 200 µl eller 1500 µl
Enhedsbokholder 1-4	Enhedsbokse med prøveklargøringskassetter eller 8-Rod Covers

i/r = ikke relevant.

* Der må ikke anvendes denatureret alkohol, som indeholder yderligere stoffer, såsom methanol eller methylethylketon.

Skuffen "Waste" (affald)

Enhedsboksholder 1-4	Tomme enhedsbokse
Affaldsposeholder	Affaldspose
Væskeaffaldsflaskeholder	Tom flaske til flydende affald

Skuffen "Eluate" (eluat)

Elueringsrack (vi anbefaler at anvende åbning 1, afkølingsposition)

Vedr. yderligere information henvises til listen over laboratorieartikler på fanen Resource på siden Product på www.qiagen.com.

Påkrævede plastikprodukter

Plastemner	Et batch 24 prøver*	To batches 48 prøver*	Tre batches 72 prøver*	Fire batches 96 prøver*
Disposable filter-tips, 200 µl†	26	50	74	98
Disposable filter-tips, 1500 µl†	72	136	200	264
Sample prep cartridges§	21	42	63	84
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* Anvendelse af mindre end 24 prøver pr. batch reducerer antallet af engangsfilterspidser påkrævet pr. kørsel.

† Der er 32 filterspidser/spidsrack.

‡ Antal nødvendige filterspidser indeholder filterspidser til 1 indholdsscanning pr. RC.

§ Der er 28 prøveklargøringskassetter/enhedsboks.

¶ Der er 12 8-Rod Covers/enhedsboks.

Bemærk: Antallet af angivne filterspidser kan afvige fra det antal, der vises på berøringsskærmen, afhængigt af indstillinger. Vi anbefaler at isætte det størst mulige antal spidser.

Elueringsmængde

Elueringsmængden vælges på berøringsskærmen. Afhængigt af prøvetypen og DNA-indholdet kan den endelige mængde variere med op til 15 µl mindre end den valgte mængde. Da eluatmængden kan variere anbefaler vi at tjekke den faktiske eluatmængde, når der anvendes et automatiseret analyseopsætningssystem, som ikke verificerer eluatmængden før overførslen. Elution i lavere mængder øger den endelige DNA-koncentration, men reducerer udbyttet en smule. Vi anbefaler at anvende en elueringsmængde, der er passende for den tilsigtede senere anvendelse.

Klargøring af prøvemateriale

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes flere oplysninger i de tilhørende sikkerhedsdatablade (Safety Data Sheets, SDS'er), som kan fås hos produktets leverandør.

Vedrørende generel indsamling, transport og opbevaring henvises til godkendte CLSI-retningslinje MM13-A "Indsamling, transport, forberedelse og opbevaring af prøver til molekylære metoder".

Ting, der skal gøres før start

- Undersøg Buffer ATL for hvidt bundfald. Om nødvendigt inkuberes i 30 minutter ved 37 °C med lejlighedsvis rystning for at opløse bundfaldet.
- Indstil en termomixer eller rysteinkubator til den påkrævede temperatur til den respektive forbehandling.

Væv

Friske og frosne væv kan anvendes til DNA-oprensning. DNA-udbytte og DNA-kvalitet vil afhænge af vævstype, kilde og opbevaringsforhold. Frisk væv kan skæres i små stykker og opbevares ved -20 °C eller -80 °C før behandling. Generelt anbefaler vi at anvende protokollen med højt indhold, som vil give øget DNA-udbytte. Protokollen med lavt indhold, sammen med 50 µl elueringsmængde, anbefales kun, hvis høje DNA-koncentrationer er nødvendige for efterfølgende analyse. Hvis ingen information om det forventede udbytte er tilgængelig, anbefaler vi at starte med 25 mg prøvemateriale vha. protokollen med højt indhold og 200 µl elueringsmængde. Afhængigt af det opnåede resultat kan prøvestørrelsen øges eller elueringsmængde reduceres i efterfølgende prøveklargøringer. Vær opmærksom på, at overfyldning af præparater sammen med små elueringsmængder kan forårsage overførsel af magnetiske partikler i eluatet og kan kompromittere DNA'ets renhed og efterfølgende analyse.

Bemærk: Når du arbejder med frosne vævsprøver, bør ISO 20184-3:2021 (E) for automatisk NA-ekstraktion fra frosne vævsprøver overvejes.

Bemærk: Prøvestabilitet afhænger i høj grad af forskellige faktorer og relaterer sig til den specifikke efterfølgende anvendelse. Det er brugerens ansvar at konsultere brugsanvisningen til den specifikke efterfølgende anvendelse, der anvendes i laboratoriet, og/eller validere hele arbejdsgangen for at etablere passende opbevaringsbetingelser.

Forbehandlingsprotokol til væv

1. Overfør vævsprøven til et 2 ml mikrocentrifugerør (ikke leveret).
2. Tilsæt 220 µl Buffer ATL.
3. Tilsæt 20 µl proteinase K og bland ved at banke let på røret.
Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
4. Anbring røret i en termomixer eller rysteinkubator, og inkubér ved 56 °C med rystning ved 900 o/min, indtil vævet er helt lyseret.
Bemærk: Lysitiden varierer afhængigt af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 3 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 3 timer som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale eller meget viskøse lysater, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 6. Lysis i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.
5. Tilsæt 4 µl RNase A (100 mg/ml), og inkubér i to min. ved stuetemperatur (15-25 °C) for at minimere indholdet af RNA i prøven, før der fortsættes til trin 6.
6. Homogenisér prøven ved at pipettere op og ned flere gange.
Bemærk: Hvis stykker af uopløseligt materiale stadig er til stede, centrifugeres ved 3000 x g i 1 minut.
7. Overfør forsigtigt 220 µl supernatant til prøverør, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.
8. For at få en oversigt over kompatible prøverør henvises til listen over laboratorieartikler på www.qiagen.com. Vi anbefaler at anvende 2 ml rør (f.eks. Sarstedt, kat.-nr. 72.693 eller 72.608). 0.

FFPE-væv

Standard-FFPE-procedurer resulterer altid i betydelig fragmentering af nukleinsyrer. For at begrænse omfanget af DNA-fragmentering skal der sørges for følgende:

- Fiksér vævsprøver i 4-10 % formalin så hurtigt som muligt efter kirurgisk fjernelse
- Anvend en fikseringstid på 14-24 timer (længere fikseringstider fører til mere alvorlig DNA-fragmentering, hvilket resulterer i ringe præstation i efterfølgende analyser)
- Dehydrér grundigt prøverne før indlejring (restformalin kan hæmme opløsningen af proteinase K)

Udgangsmaterialet til DNA-oprensning skal være friske, afskårne sektioner af FFPE-væv. Op til 4 sektioner, hver med en tykkelse på op til 10 µm eller 8 sektioner med en tykkelse på op til 5 µm og et overfladeareal på op til 250 mm², kan behandles i én prøveklargøring. Hvis information om dit udgangsmaterials beskaffenhed ikke er tilgængelig, anbefaler vi, at du starter med højst 3 sektioner til en enkelt prøveklargøring. Afhængigt af DNA-udbyttet og dets renhed kan det være muligt at anvende op til 8 sektioner i efterfølgende klargøringer.

Bemærk: Når du arbejder med FFPE-væv, bør ISO 20166-3:2018 (E) for automatisk NA-ekstraktion fra FFPE-vævsprøver overvejes for yderligere information om prøvehåndtering.

Bemærk: FFPE-vævsprotokoller er specielt designede til kun samtidig at oprense lave mængder RNA. Dette vil føre til en reduceret fotometrisk målingsværdi sammenlignet med værdier, der er opnået med det manuelle QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Forbehandlingsprotokol til FFPE-væv

Metode 1: Deparaffinering vha. Deparaffinization Solution

1. Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken.
2. Skær op til 4 sektioner 10 µm tykt eller op til 8 sektioner 5 µm tykt.
Bemærk: Hvis prøveoverfladen er blevet udsat for luft, bortskaffes de første 2-3 sektioner.
3. Anbring straks sektionerne i et 2 ml Sarstedt-rør (ikke leveret, kat.-nr. 72.693 eller 72.608), der er kompatibelt med QIASymphony SP's prøveholder.
4. Tilsæt 200 µl Buffer ATL til sektionerne.
5. Tilsæt 20 µl proteinase K.
Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Tilsæt 160 µl eller 320 µl Deparaffinization Solution (se nedenstående tabel), og bland vha. vortexer.

Sektionernes tykkelse	Antal sektioner	Volumen af Deparaffinization Solution
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Anbring røret i en termomixer eller rysteinkubator og inkubér ved 56 °C i 1 time med rystning ved 1000 o/min., eller indtil vævet er helt lyseret.

Bemærk: Lysistiden varierer afhængigt af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 1 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 1 timer som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale pelletteres ved centrifugering som beskrevet i trin 10. Lysis i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

8. Inkubér ved 90 °C i 1 time.

Bemærk: Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvist formaldehydmodifikationen af nukleinsyrer. Længere inkuberingstider eller højere inkuberingstemperaturer kan resultere i mere fragmenteret DNA. Hvis der kun anvendes en varmeblok, skal prøven forblive ved stuetemperatur efter 56 °C inkubering, indtil varmeblokken har nået 90 °C.

9. Tilsæt 2 µl RNase A (100 mg/ml) til den laveste fase, og inkubér i to min. ved stuetemperatur for at minimere indholdet af RNA i prøven, før der fortsættes til trin 10. Lad prøven afkøle til stuetemperatur, før der tilsættes RNase A.

10. Centrifuger ved fuld hastighed i 1 min. ved stuetemperatur.

11. Overfør forsigtigt rørene (med begge faser) til prøveholderen på QIASymphony SP.

Metode 2: Deparaffinering vha. xylene

1. Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken.

2. Skær op til 4 sektioner 10 µm tykt eller op til 8 sektioner 5 µm tykt.

Bemærk: Hvis prøveoverfladen er blevet udsat for luft, bortskaffes de første 2-3 sektioner.

3. Anbring straks sektionerne i et 1,5 eller 2 ml mikrocentrifugerør (ikke leveret) og der tilsættes 1 ml xylene til prøven. Luk låget, og vortex kraftigt i 10 sekunder.

4. Centrifuger ved fuld hastighed i 2 min. ved stuetemperatur.

5. Fjern supernatanten ved pipettering. Pelleteringen må ikke fjernes.

6. Tilsæt 1 ml ethanol (96-100 %) til pellet'en og bland med vortexer.

Bemærk: Ethanolet ekstraherer restxylene fra prøven.

7. Centrifuger ved fuld hastighed i 2 min. ved stuetemperatur.

8. Fjern supernatanten ved pipettering. Pelleteringen må ikke fjernes.

Bemærk: Fjern forsigtigt eventuelt restethanol vha. en fin pipettespids.

9. Åbn røret, og inkubér ved stuetemperatur (15-25 °C) i 10 min., eller indtil al det resterende ethanol er fordampet.

Bemærk: Inkubation kan udføres ved temperaturer på op til 37 °C.

10. Resuspendér pelleten i 220 µl Buffer ATL.

11. Tilsæt 20 µl proteinase K og bland med vortexer.

Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

12. Inkubér ved 56 °C i 1 time (eller indtil prøven er blevet fuldstændig lyseret).

Bemærk: Lysistiden varierer afhængigt af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 1 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 1 timer som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 16. Lysis i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

13. Inkubér ved 90 °C i 1 time.

Bemærk: Inkuberingen ved 90 °C i Buffer ATL reverserer delvist formaldehydmodifikationen af nukleinsyrer. Længere inkuberingstider eller højere inkuberingstemperaturer kan resultere i mere fragmenteret DNA. Hvis der kun anvendes en varmeblok, skal prøven forblive ved stuetemperatur efter 56 °C inkubering, indtil varmeblokken har nået 90 °C.

14. Centrifuger prøven kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.
15. Tilsæt 2 µl RNase A (100 mg/ml), og inkubér i to min. ved stuetemperatur for at minimere indholdet af RNA i prøven, før der fortsættes til trin 16. Lad prøven afkøle til stuetemperatur, før der tilsættes RNase A.
16. Overfør forsigtigt 220 µl af lysatet til prøverør, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.

Bemærk: Hvis lysater indeholder uopløst materiale, centrifugeres de for fuld hastighed i 2 min. ved stuetemperatur før supernatanten overføres til prøverør. For at få en oversigt over kompatible prøverør henvises til listen over laboratorieartikler på www.qiagen.com. Vi anbefaler at anvende 2 ml rør (f.eks. Sarstedt, kat.-nr. 72.693 eller 72.608).

Opbevaring af eluater

Det anbefales at fjerne eluatpladen fra skuffen "Eluate" (eluat), straks efter at kørslen er færdig. Elueringsplader kan blive siddende natten over i QIASymphony SP, efter at kørslen er færdig (maks. 12 timer, inkl. kørselstiden; anbefalede omgivende forhold: 18-26 °C og 20-75 % relativ luftfugtighed). Afhængigt af temperatur og luftfugtighed kan eluatet kondensere eller fordampe.

Ved korttidsopbevaring kan eluater opbevares ved stuetemperatur i op til 2 uger. Ved langtidsopbevaring anbefaler vi opbevaring ved 2-8°C, -20 °C eller -80 °C.

Bemærk: Eluatets stabilitet afhænger i høj grad af forskellige faktorer og relaterer sig til den specifikke efterfølgende anvendelse. Den er blevet fastlagt for QIASymphony DSP DNA Mini Kit i forbindelse med typiske efterfølgende anvendelser. Det er brugerens ansvar at konsultere brugsanvisningen til den specifikke efterfølgende anvendelse, der anvendes i laboratoriet, og/eller validere hele arbejdsgangen for at etablere passende opbevaringsbetingelser.

Vigtigt punkt før start

- QIASymphony magnetiske partikler oprenser både RNA og DNA, hvis begge er til stede i prøven. Hvis RNA-frit DNA er påkrævet, tilsættes RNase A til prøven i trinnet angivet i den respektive forbehandlingsprotokol.





Begrænsninger og interfererende stoffer

Under udviklingen af QIASymphony DSP DNA Mini Kit, blev der ikke identificere nogen interfererende stoffer med negativ indvirkning på klargøring af prøve.

Bemærk: Testning blev udført under anvendelse af typiske efterfølgende anvendelser med henblik på en vurdering af kvaliteten af de ekstraherede nukleinsyrer. Forskellige efterfølgende anvendelser kan dog have forskellige krav med hensyn til renhed (dvs. fravær af potentielle interfererende stoffer), så identifikation og testning af relevante stoffer skal også etableres som en del af udviklingen af den efterfølgende anvendelse for enhver arbejdsgang, der involverer QIASymphony DSP DNA Mini Kits.

Symboler

De følgende symboler forekommer i dette dokument. For en komplet liste over symboler, der bruges i brugsanvisningen eller på emballagen og mærkningen, henvises til håndbogen.

Symbol	Symboldefinition
	Dette produkt opfylder kravene i EU-direktivet 2017/746 for medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik.
	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik
	Katalognummer
Rn	R står for revision af brugsanvisningen, og n står for revisionsnummeret
	Producent

Revisionshistorik

Revision	Beskrivelse
R1, juni 2022	<p>Version 2, Revision 1</p> <ul style="list-style-type: none">• Opdatering til version 2 af hensyn til overholdelse af regler om IVD• Tilføjelse af afsnittet Begrænsninger og interfererende stoffer• Tilføjelse af afsnittet Opbevaring af eluater• Tilføjelse af afsnittet Symboler• Opdatering af afsnittet Klargøring af prøvemateriale

Vedrørende opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle håndbog eller brugermanual til QIAGEN® kit. QIAGEN kit-håndbøger og -brugermanualer kan fås via www.qiagen.com eller rekvireres hos QIAGEN Teknisk Service eller den lokale distributør.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); BD™ (Becton Dickinson and Company) ; Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Registrerede navne, varemærker osv., der bruges i dette dokument, er beskyttet af den relevante lovgivning, også når de ikke er specifikt markeret som sådan.
06/2022 HB-3029-S07-001 © 2022 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.