

Únor 2017

Příručka pro sadu QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue



Verze 1



Pro diagnostiku in vitro



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NĚMECKO



R3 1062689CZ



Obsah

Účel použití.....	5
Souhrn a vysvětlení.....	5
Princip metody.....	6
Dodávané materiály.....	8
Obsah sady	8
Potřebný materiál, který není součástí dodávky.....	9
Varování a bezpečnostní opatření.....	10
Uchovávání reagensů a nakládání s nimi.....	11
Nakládání se vzorky a jejich uchovávání.....	12
Postup.....	13
Příprava pufrů.....	14
Výchozí materiál.....	15
Postup manipulace, který zabraňuje zkřížené kontaminaci.....	15
Centrifugace.....	16
Zpracování kolonek QIAamp MinElute v mikroodstředivce.....	17
Eluce purifikované DNA.....	17
Protokol: Izolování genomové DNA z tkáňových řezů FFPE.....	19
Kontrola kvality.....	23
Omezení.....	23
Charakteristiky funkčních vlastností.....	24
Symboly.....	24
Kontaktní údaje.....	25
Informace o způsobu objednávání.....	26

Účel použití

Sada QIAamp DSP DNA FFPE Tissue je systém, který využívá technologii silikátové membrány (technologie QIAamp) k izolaci a purifikaci genomové DNA z biologických vzorků fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Produkt je určen pro použití jen kvalifikovanými uživateli, například techniky a lékaři, kteří jsou vyškoleni v technikách molekulární biologie pro účely diagnostiky in vitro (IVD); je určen pro ruční preparaci vzorků a neposkytuje žádné výsledky kvalitativních ani kvantitativních testů.

Souhrn a vysvětlení

Sada QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se používá k purifikaci DNA z tkáňových řezů FFPE. Využívá zavedenou technologii QIAamp DNA Micro pro purifikaci genomové a mitochondriální DNA ze vzorků o malém objemu nebo velikosti. Sada kombinuje selektivní vazebné vlastnosti silikátové membrány s flexibilními elučními objemy.

Lytické podmínky umožňují účinnou purifikaci genomové DNA z tkáňových řezů FFPE bez nutnosti inkubace přes noc. Inkubace při zvýšené teplotě po digesci proteinázou K částečně odstraňuje formalínem vyvolané zesíťování uvolněné DNA, což může zlepšit výtěžnost a funkční vlastnosti DNA v navazujících testech. Upozorňujeme, že DNA izolovaná ze vzorků FFPE má obvykle nižší molekulovou hmotnost než DNA z čerstvých nebo zmrazených vzorků. Stupeň fragmentace závisí na druhu a stáří vzorku a podmínkách při fixaci.

Po lýze vzorku je pro současné zpracování několika vzorků vhodný postup pro systém QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

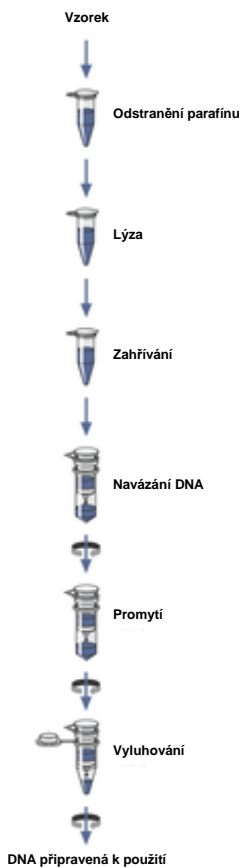
Uživatel nese odpovědnost za validaci funkčních vlastností systému u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností provedených společností QIAGEN a popsaných v příručce.

Princip metody

Postup práce se systémem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se skládá ze šesti kroků (Obrázek 1):

- Odstranění parafínu: Parafín se rozpustí v xylenu a odstraní.
- Lýza: Vzorek se lýzuje při 56 °C za denaturačních podmínek s proteinázou K.
- Zahřívání: Inkubace při 90 °C ruší formalínem vyvolané zesíťování.
- Navázání: DNA se naváže na membránu a průsak s kontaminujícími látkami.
- Promytí: Dojde k vymytí zbytkových kontaminujících látek.
- Vyluhování: Z membrány je vyluhována čistá, koncentrovaná DNA.

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



Obrázek 1. Postup práce se systémem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Dodávané materiály

Obsah sady

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Katalogové č.			60404
Počet reakcí			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (Kolonky QIAamp MinElute s promývacími zkumavkami)	COL	50
WT	Wash Tubes (Promývací zkumavky) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (Eluční zkumavky) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Lyzační zkumavky) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Pufr pro lýzu tkání)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer (Lyzační pufr)*	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Promývací pufr 1)* (koncentrát)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Promývací pufr 2)† (koncentrát)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer (Eluční pufr)†	ELU BUF	12 ml
PK	Proteináza K	PROTK	1,25 ml
–	Návod k použití (příručka)	H B	1

* Obsahuje sůl guanidinu. Není kompatibilní s dezinfekčními přípravky obsahujícími bělicí prostředky. Varování a bezpečnostní opatření viz strana 10.

† Obsahuje azid sodný jako konzervační látku.

Potřebný materiál, který není součástí dodávky

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (safety data sheets, SDS), které obdržíte od dodavatele výrobku.

Reagencie

- Xylen
- Etanol (96–100 %)*

Spotřební materiál

- Bude-li rozhodnuto, že se nepoužijí zkumavky ze sady, doporučujeme mikrocentrifugační zkumavky 1,5 ml nebo 2 ml (pro lýzu) a mikrocentrifugační zkumavky 1,5 ml (pro vyluhování) (dodává firma Eppendorf® [Safe-Lock: kat. č. 022363204, US; kat. č. 0030 120.086, Evropa] nebo Sarstedt [kat. č. 72.690]). Doporučujeme zkumavky kónického tvaru bez DNázy/RNázy s pevnými uzávěry.
- Pipety a pipetovací špičky (pro zamezení zkřížené kontaminace důrazně doporučujeme pipetovací špičky s aerosolovými bariérami).

Vybavení

- Thermomixer†, vyhřívavý orbitální inkubátor, termoblok nebo vodní lázeň s možností inkubace při teplotě 56 °C, 70 °C a 90 °C
- Mikrocentrifuga† s rotorem pro zkumavky 2 ml
- Třepačka vortex

* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje jiné látky, například metanol nebo metyletylketon.

† K zajištění správného zpracování vzorků při metodách QIAamp DSP DNA FFPE důrazně doporučujeme použití přístrojů kalibrovaných podle doporučení výrobce.

Varování a bezpečnostní opatření

Pro diagnostiku in vitro

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázově použitelné rukavice a ochranné brýle. Bližší informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (SDS). Bezpečnostní listy jsou k dispozici také online v PDF formátu na stránkách www.qiagen.com/safety, kde můžete najít, přečíst a vytisknout bezpečnostní listy všech sad a součástí sad QIAGEN®.



UPOZORNĚNÍ: NEPŘIDÁVEJTE roztoky bělicích prostředků nebo kyselin přímo do odpadních materiálů z přípravy vzorků.

Pufr AL a pufr AW1 obsahuje guanidin hydrochlorid, který může vytvářet vysoce reaktivní sloučeniny při smíšení s bělicím činidlem.

Pokud dojde k rozlití kapalin obsahujících tyto pufrы, vyčistěte místo vhodným laboratorním detergentem a vodou. Pokud rozlitá kapalina obsahuje případná infekční agens, vyčistěte zasažené místo nejdříve laboratorním detergentem a vodou, a potom 1% (v/v) roztokem chlomanu sodného.

Pro jednotlivé komponenty sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue platí následující pokyny týkající se rizika a bezpečnostních opatření.

Pufr AL



Obsahuje: guanidinhydrochlorid; kyselinu maleinovou. Varování! Může být zdraví škodlivý při požití nebo při vdechování. Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Přetrvává-li podráždění očí: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyměňte kontaktní čočky, jsou-li nasazeny a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím ho vyperte. PŘI STYKU S KŮŽÍ: Jemně omyjte velkým množstvím vody a mýdla. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

Pufr ATL



Varování! Způsobuje mírné podráždění pokožky. Při podráždění kůže: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.

Pufr AW1



Obsahuje: guanidinhydrochlorid. Varování! Zdraví škodlivý při požití nebo při vdechování. Dráždí kůži. Způsobuje vážné podráždění očí. Necítíte-li se dobře, volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. Odstraňte obsah/obal ve schváleném zařízení pro likvidaci odpadu. Kontaminovaný oděv svlékněte a před opětovným použitím ho vyperte. Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít.

Proteináza K



Obsahuje: proteinázu K. Varování! Způsobuje mírné podráždění pokožky. Při vdechování může vyvolat příznaky alergie nebo astmatu nebo dýchací potíže. Zamezte vdechování prachu/dýmu/plynu/mlhy/par/aerosolů. Při dýchacích potížích: Volejte TOXIKOLOGICKÉ INFORMAČNÍ STŘEDISKO nebo lékaře. PŘI VDECHNUTÍ: Při obtížném dýchání přeneste postiženého na čerstvý vzduch a ponechte jej v klidu v poloze usnadňující dýchání. Používejte vybavení pro ochranu dýchacích cest.

Uchovávání reagensů a nakládání s nimi

Kolonky QIAamp MinElute by měly být po dodání uloženy při teplotě 2–8 °C a lze je použít do data expirace uvedeného na obalu sady.

Všechny pufrů se mohou uchovávat při pokojové teplotě (15–25 °C) a jsou stabilní do data expirace sady. Rozpuštěný pufr AW1 a AW2 je však možné skladovat při pokojové teplotě (15–25 °C) až 1 rok nebo do data expirace vyznačeného na sadě podle toho, která lhůta vyprší dříve.

Sada QIAamp DSP DNA FFPE Tissue obsahuje roztok proteinázy K připravený k použití, který se dodává ve formě zásobního pufru se speciálním složením. Proteináza K je stabilní až do data expirace sady, je-li uchovávána při pokojové teplotě (15–25 °C).

Nakládání se vzorky a jejich uchovávání

Pro omezení rozsahu fragmentace DNA je třeba používat standardní postupy fixování formalínem a zalévání do parafínu. Zabezpečte následující:

- Vzorky tkání fixujte ve formalínu podle laboratorního protokolu (obvykle se používá 10% neutrální pufrovaný formalín) co nejdříve po chirurgickém vyjmutí.
- Použijte dobu fixace 14–24 hodin. Omezte dobu fixace, neboť dlouhodobá fixace (například > 24 hodin) může vést k silnější fragmentaci DNA a snížené funkčnosti následných testů).
- Vzorky před zalitím důkladně dehydratujte (zbytkový formalín může inhibovat digesci proteinázy K).

DNA se vyluhuje v pufru ATE a je ihned připravena k použití v amplifikačních reakcích nebo k uskladnění (podmínky závisí na požadavcích uživatele). Doporučené podmínky skladování pro konkrétní navazující aplikace QIAGEN naleznete v příručkách k příslušným sadám.

Postup

Důležité body před zahájením

- Všechny reagentie dodané v sadě QIAamp DSP DNA FFPE Tissue jsou určeny k použití výhradně s ostatními reagentii ze stejné sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Má-li být zachován optimální výkon testu, nelze se sadou používat žádné náhradní reagentie.
- Po obdržení sady zkontrolujte, zda nejsou její komponenty poškozeny. V případě poškození obalů nebo láhví s puřem kontaktujte oddělení technických služeb QIAGEN nebo místního distributora. V případě rozlití tekutiny si přečtěte část „Varování a bezpečnostní opatření“, strana 10). Nepoužívejte poškozené komponenty sady, protože použití poškozených komponent by mohlo negativně ovlivnit účinnost sady.
- Při práci se sadou nepoužívejte komponenty jiných sad, pokud nemají stejné číslo šarže.
- Zamezte mikrobiální kontaminaci reagentii sady.
- Tuto sadu smí používat pouze personál školený v laboratorních metodách in vitro.
- Při zacházení s reagentii a vzorky vždy používejte latexové nebo vinylové rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci z povrchu kůže nebo ze zaprášeného laboratorního vybavení. Ruce a prachové částice mohou přenášet bakterie a plísňe a jsou to časté zdroje kontaminace. Rukavice často vyměňujte a zkumavky uchovávejte zavřené.
- Nepoužité puřy, průsaky a zbytky vzorků je nutné zlikvidovat podle místních postupů.
- Používáte-li svůj vlastní plastový spotřební materiál, v celém postupu purifikace se doporučuje používat jednorázové polypropylenové kónické zkumavky 1,5–2 ml s nízkou smáčivostí, neobsahující DNázu/RNázu, s pevnými uzávěři.
- Všechny postupy centrifugace provádějte při pokojové teplotě (15–25 °C).
- Všechny puřy je nutné skladovat při pokojové teplotě (15–25 °C) a před použitím je důkladně promíchat.

- Nastavte Thermomixer nebo vyhřívavý orbitální inkubátor na teplotu 56 °C pro použití v kroku 11. Pokud Thermomixer ani vyhřívavý orbitální inkubátor nejsou k dispozici, lze použít termoblok nebo vodní lázeň.
- Pokud pufr AL nebo pufr ATL obsahuje precipitát, rozpustě jej ohřevem na 70 °C s šetrným mícháním.
- Zajistěte, aby pufr AW1 a pufr AW2 byl připraven podle níže uvedených pokynů.
- Postupy kontroly jakosti ve společnosti QIAGEN popisují funkční testování sady před vydáním pro každou jednotlivou šarží sady. Nemíchejte proto reagencie z různých šarží, ani nekombinujte jednotlivé reagencie z různých šarží reagentů.

Příprava pufků

Příprava pufru ATL

- Před zahájením práce zkontrolujte, zda se v pufru ATL nevytvořil precipitát. Podle potřeby jej rozpustě ohřevem na 70 °C s šetrným mícháním.

Příprava pufru AL

- Před zahájením práce zkontrolujte, zda se v pufru AL nevytvořil precipitát. Podle potřeby jej rozpustě ohřevem na 70 °C s šetrným mícháním.

Příprava pufru AW1

- Do lahvičky s 19 ml koncentrovaného pufru AW1 přidejte 25 ml etanolu (96–100%). Zaškrtnutím políčka na štítku na lahvičce označte, že byl přidán etanol. Rozpuštěný pufr AW1 je možné skladovat při pokojové teplotě (15–25 °C) až 1 rok nebo do data expirace vyznačeného na sadě podle toho, která lhůta vyprší dříve. Doporučujeme napsat datum rekonstituce na štítek na pufru.

Poznámka: Před zahájením postupu rozpuštěný pufr AW1 promíchejte protřepáním.

Příprava pufru AW2

- Do lahvičky s 13 ml koncentrovaného pufru AW2 přidejte 30 ml etanolu (96–100%). Zaškrtnutím políčka na štítku na lahvičce označte, že byl přidán etanol. Rozpuštěný pufr AW2 je možné skladovat při pokojové teplotě (15–25 °C) až 1 rok nebo do data expirace vyznačeného na sadě podle toho, která lhůta vyprší dříve. Doporučujeme napsat datum rekonstituce na štítek na pufru.

Poznámka: Před zahájením postupu rozpuštěný pufr AW2 promíchejte protřepáním.

Výchozí materiál

Výchozím materiálem pro purifikaci DNA jsou řezy tkáně FFPE (ideálně čerstvé). V jednom preparátu lze zkombinovat několik řezů. Nemáte-li o povaze výchozího materiálu žádné informace, doporučujeme začít s maximálně třemi řezy na jeden preparát.

Uživatel by měl optimalizovat počet řezů, tloušťku řezů a plochu řezů podle postupů používaných v dané laboratoři. Jestliže se sada používá ve spojení s navazující aplikací QIAGEN, přečtěte si návod v příslušné příručce.

Postup manipulace, který zabraňuje zkřížené kontaminaci

Vzhledem k citlivosti technologií amplifikace kyseliny nukleové je při manipulaci s kolonkami QIAamp MinElute nutné dodržovat níže uvedená bezpečnostní opatření, aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci vzorků:

- Zkumavky s tkání nenaplňujte příliš.
- Při seškrabování tkáně vyměňujte mezi jednotlivými vzorky skalpely.
- Opatrně vložte vzorek nebo roztok do kolonky QIAamp MinElute. Vzorek do kolonky QIAamp MinElute napipetujte tak, aby nedošlo k navlhčení okraje kolonky.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. Doporučujeme použít pipetovací špičky s aerosolovou bariérou.

- Při promývání vzorků vždy použijte nové promývací zkumavky.
- Před mícháním ve vortexu a před odstředováním zkontrolujte, že jsou pevně uzavřena víčka.
- Před odstředováním zkontrolujte, že je kolonka QIAamp MinElute pevně uzavřená.
- Po provedení všech kroků protřepávání na pulzní třepačce a inkubace při 90 °C mikrocentrifugační zkumavky krátce odstředte, aby se odstranily kapky z vnitřní strany uzávěrů.
- Vždy otevřete jen jednu kolonku QIAamp MinElute a dbejte na to, aby nedošlo ke vzniku aerosolů.
- Mezi jednotlivými vzorky vždy vyměňte skalpely.
- Před každým přenosem kapalných materiálů vždy vyměňte pipetovací špičky. K minimalizaci zkřížené kontaminace doporučujeme používat pipetovací špičky s aerosolovou bariérou a nepoužívat vícekrokové pipety.
- Vždy používejte jednorázové rukavice a pravidelně kontrolujte, zda nedošlo k jejich kontaminaci testovaným vzorkem. Máte-li podezření, že došlo k jejich kontaminaci, rukavice vyhodte.
- Vždy mějte otevřenou jen jednu zkumavku.

Centrifugace

Kolonky QIAamp MinElute jsou vhodné pro většinu standardních mikrocentrifugačních zkumavek 1,5–2 ml. Samostatně jsou k dispozici další promývací zkumavky 2 ml (QIAGEN, kat. č. 19201). Centrifugace kolonek QIAamp MinElute se provádí při rychlosti cca 6000 x g ke snížení hlučnosti odstředivky. Centrifugace při plné rychlosti nezvyší výtěžnost DNA. Centrifugace kolonek QIAamp MinElute při maximální rychlosti je však nutná ve dvou krocích postupu: při odstředování do sucha po promytí membrán a při vyluhování. Centrifugace při plné rychlosti je také nutná ke stažení vzorku po ošetření xylenem a promytí etanolem.

Veškeré centrifugační kroky je nutno provádět při pokojové teplotě (15–25 °C). Nízká teplota při centrifugaci může vést k suboptimální extrakci.

Zpracování kolonek QIAamp MinElute v mikroodstředivce

- Kolonky QIAamp MinElute před vložením do mikroodstředivky vždy uzavřete.
- Nedotýkejte se membrány kolonky QIAamp MinElute pipetovací špičkou.
- Frakce v průsaku mohou obsahovat nebezpečný odpad a je nutné je řádně zlikvidovat.
- Pro účinné souběžné zpracování několika vzorků doporučujeme naplnit stojan promývacími zkumavkami, do nichž lze po odstředění přenést kolonky QIAamp MinElute. Použité promývací zkumavky obsahující průsak je možné vyhodit a do mikroodstředivky přímo vložit nové promývací zkumavky s kolonkami QIAamp MinElute.
- Zajistěte úplnou dohledatelnost vzorků během celého postupu.

Eluce purifikované DNA

U navazující aplikací, u kterých jsou potřeba malé výchozí objemy (např. u některých analýz PCR), může citlivost testu zvýšit koncentrovanější eluát, což však může také vést k vyšší koncentraci potenciálních inhibitorů.

Zvýšení elučního objemu sníží koncentraci DNA v eluátu.

Objem získaného eluátu může být o cca 5 µl menší než objem pufru ATE aplikovaného do kolonky QIAamp MinElute. Například eluční objem 20 µl vede k získání ≥ 15 µl eluátu. Objem získaného eluátu závisí na povaze vzorku.

Uživatel nese odpovědnost za optimalizaci elučního objemu pro postupy používané v jeho laboratoři. Doporučené eluční podmínky požadované pro konkrétní navazující aplikace QIAGEN naleznete v příručkách k sadám.

Výtěžky se mohou zvýšit, pokud bude kolonka inkubována puřem ATE při pokojové teplotě po dobu např. 5 minut před centrifugací. Eluovaná DNA se shromařduje v elučních zkumavkách 1,5 ml (součást sady). Podmínky skladování vyluhované DNA závisí na podmínkách určených uživatelem. Doporučené podmínky skladování pro konkrétní navazující aplikace QIAGEN naleznete v příručkách k sadám.

Protokol: Izolování genomové DNA z tkáňových řezů FFPE

Postup

1. Skalpelem odstraňte přebytečný parafín z bloku vzorku.
2. Proveďte řezy podle standardní laboratorní praxe (viz část „Výchozí materiál“, strana 15). Uživatel by měl optimalizovat počet řezů, tloušťku řezů a plochu řezů podle postupů používaných v dané laboratoři. Zajistěte dohledatelnost vzorků během celého postupu.
3. Ihned seškrabejte tkáň z řezů sterilním skalpelem v lyzační zkumavce (součást sady). Ověřte, že do zkumavky byla vložena všechna dostupná tkáň. Ke vzorku přidejte 1 ml xylenu, zavřete uzávěr a intenzivně míchejte, dokud se parafín nerozpustí (např. 10 s). Ověřte, že je zkumavka zcela uzavřená, aby nedošlo k úniku xylenu, zkřížené kontaminaci vzorků a možnému kontaktu s xylenem.

Poznámka: Xylen používejte v digestoři nebo jiném vhodném ochranném zařízení.

4. Centrifugací při maximální rychlosti cca 2 minuty při pokojové teplotě získáte hrudku tkáně. Pokud se žádná hrudka tkáně nevytvoří, tento krok zopakujte.

Poznámka: Nízká teplota při centrifugaci může vést k suboptimální extrakci.

5. Odstraňte supernatant pipetováním a zlikvidujte jej. Hrudku si ponechejte. Supernatant obsahuje xylen, který je nebezpečným odpadem a je nutné jej řádně zlikvidovat podle místních předpisů.
6. K hrudce tkáně přidejte 1 ml etanolu (96–100%) a důkladně promíchejte ve vortexu. Etanol ze vzorku extrahuje zbytkový xylen, který je nutné řádně zlikvidovat.

7. Centrifugujte plnou rychlostí cca 2 minuty při pokojové teplotě.

Supernatant odstraňte pipetováním. Neodebírejte žádnou hrudku.

Opatrně odeberte jakýkoliv zbytkový etanol špičkou jemné pipety. Otevřete zkumavku a inkubujte při teplotě 15–40 °C, dokud se neodpaří všechen zbytkový etanol. Odstranění zbytkového etanolu má pro úspěšnost extrakce zásadní význam.

Poznámka: Nižší inkubační teplota prodlužuje dobu odpařování, kdežto vyšší teplota může hrudku příliš vysušit, takže bude obtížné ji suspendovat.

8. Hrudku znovu suspendujte ve 180 µl pufru ATL. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte ve vortexu.

Poznámka: K zajištění maximální výtěžnosti musí být hruška dobře resuspendovaná v pufru ATL.

9. Inkubujte přibližně 1 h při 56 °C ±3 °C (dokud nedojde k úplné lýze vzorku).

10. Inkubujte po dobu 1 hodiny ±5 min. při teplotě 90 °C ±5 °C.

Inkubace při 90 °C v pufru ATL částečně revertuje formaldehydovou modifikaci nukleových kyselin. Kratší inkubační doba nebo nižší inkubační teploty mohou mít vliv na kvalitu a množství DNA. Pokud použijete pouze jeden topný blok, nechte vzorek při pokojové teplotě po inkubaci při 56 °C, dokud topný blok nedosáhne 90 °C.

11. Krátce odstředějte zkumavku pro odstranění kapek z vnitřní strany víka.

12. Ke vzorku přidejte 200 µl pufru AL a důkladně promíchejte ve vortexu. Pak přidejte 200 µl etanolu (96–100%) a opět důkladně promíchejte ve vortexu.

Je důležité, aby vzorek, pufr AL a etanol byly ihned a důkladně promíchány ve vortexu nebo pipetováním, aby byl získán homogenní roztok. Pufr AL a etanol je možné předmíchat a přidat společně v jednom kroku, aby se při zpracování několika vzorků ušetřil čas. Po přidání pufru AL a etanolu se může vytvořit bílý precipitát. Tento precipitát s postupem QIAamp neinterferuje. Vždy použijte čerstvě namíchanou směs a ihned po použití ji vyhodte.

13. Krátce odstředějte zkumavku pro odstranění kapek z vnitřní strany víka.

14. Opatrně přeneste celý lyzát do kolonky QIAamp MinElute (ve 2ml promývací zkumavce), aniž by došlo k navlhčení okraje, zavřete víko a centrifugujte při rychlosti cca 6000 x g po dobu ≥ 1 min. Vložte kolonku QIAamp MinElute do čisté promývací zkumavky 2 ml (součást sady) a vyhodte promývací zkumavku obsahující průsak do odpadu.

Pokud lyzát zcela neprošel membránou po centrifugaci, odstředujte znovu při vyšší rychlosti, dokud se kolonka QIAamp MinElute nevyprázdní.

15. Opatrně otevřete kolonku QIAamp MinElute a přidejte 500 μ l rozpuštěného pufru AW1 bez zvlhčení okraje. Zavřete víko a centrifugujte při rychlosti cca 6000 x g po dobu ≥ 1 min. Vložte kolonku QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky a vyhodte promývací zkumavku obsahující průsak do odpadu.

16. Opatrně otevřete kolonku QIAamp MinElute a přidejte 500 μ l rozpuštěného pufru AW2 bez zvlhčení okraje. Zavřete víko a centrifugujte při rychlosti cca 6000 x g po dobu ≥ 1 min. Vložte kolonku QIAamp MinElute do čisté 2ml promývací zkumavky a vyhodte promývací zkumavku obsahující průsak do odpadu.

Je třeba zamezit kontaktu kolonky QIAamp MinElute s průsakem. Zajistěte vyvážení rotoru odstředivky. Rotory některých odstředivek mohou při zpomalení vibrovat, což má za následek průsak obsahující ethanol, který přijde do styku s kolonkou QIAamp MinElute. Při vyjímání kolonky QIAamp MinElute a promývací zkumavky z rotoru dbejte opatrnosti, aby nedošlo ke kontaktu průsaku s kolonkou QIAamp MinElute.

17. Odstředujte při plné rychlosti (přibližně 20 000 x g) po dobu cca 3 minut, aby se membrána vysušila.

Přenos ethanolu do eluátu může interferovat s některými aplikacemi prováděnými v dalších stupních.

18. Vložte kolonku QIAamp MinElute do čisté 1,5ml eluční zkumavky (součást sady) a promývací zkumavku obsahující průsak zlikvidujte. Opatrně otevřete víko kolonky QIAamp MinElute a přidejte 20–200 µl pufru ATE do středu membrány.

DŮLEŽITÉ: Při použití malých elučních objemů (< 50 µl) odměřte pufr ATE do středu membrány, aby bylo zajištěno úplné vyluhování navázané DNA. Kolonky QIAamp MinElute umožňují flexibilitu při výběru elučního objemu. Zvolte objem podle požadavků navazující aplikace. Objem eluátu bude o cca 5 µl menší než objem elučního roztoku aplikovaného do kolonky.

19. Zavřete víko a inkubujte alespoň 1 min. při pokojové teplotě (15–25 °C). Odstředujte při plné rychlosti (přibližně 20 000 x g) po dobu ≥ 1 min.

Inkubace kolonky QIAamp MinElute s pufrem ATE po dobu přibližně 5 min. při pokojové teplotě před odstředěním může zvýšit výtěžek DNA.

Kontrola kvality

V souladu s ISO certifikovaným systémem řízení jakosti společnosti QIAGEN (Quality Management System) je každá šarže sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue podrobena testům předem definovaných parametrů, které zajišťují odpovídající jakost produktů.

Omezení

Účinnost sady byla stanovena pomocí tkání fixovaných formalínem a zalitých do parafínu (tkání FFPE) za účelem izolování genomové DNA.

Uživatel nese odpovědnost za validaci funkčních vlastností systému u všech postupů používaných v dané laboratoři, které nejsou zahrnuty ve studiích funkčních vlastností provedených společnostmi QIAGEN a popsaných v příručce.

Pro minimalizaci rizika negativního dopadu na diagnostické výsledky je zapotřebí používat pro aplikace v dalších stupních analýzy odpovídající kontroly. Pro další validaci se doporučují pokyny „International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH“ (Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků (ICH)) uvedené v dokumentu „Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology“ (Validace analytických postupů ICH Q2(R1): text a metodologie).

Všechny získané diagnostické výsledky je nutno interpretovat společně s dalšími klinickými nebo laboratorními nálezy.











Pomocí sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue je možné společně s DNA purifikovat i RNA, je-li ve vzorku přítomna.

Charakteristiky funkčních vlastností

Charakteristiky funkčních vlastností sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue naleznete na stránkách www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.

Symboly

Na obalu a značení se mohou objevit následující symboly:

Symbol	Definice symbolu
	Obsahuje dostatek činidel pro <N> reakcí.
	Datum použitelnosti
	Prostředek zdravotnické techniky pro diagnostiku in vitro
	Po dodání
	Katalogové číslo
	Číslo šarže
	Číslo materiálu
	Součásti
	Obsahuje
	Číslo

Symbol**Definice symbolu**

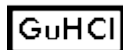
Zapište aktuální datum přidání etanolu do lahvičky



Etanol



Přidání



Guanidin hydrochlorid



Kyselina maleinová



Globální číslo obchodní položky



Teplotní omezení



Výrobce



Viz návod k použití



Pozor

Kontaktní údaje

Technickou pomoc a další informace si vyhledejte v našem centru technické podpory na stránkách **www.qiagen.com/Support**, nebo se obraťte telefonicky na telefonní číslo 00800-22-44-6000, nebo kontaktujte některé z technických servisních oddělení společnosti QIAGEN nebo místního distributora (viz zadní strana obálky nebo navštivte stránky **www.qiagen.com**).

Informace o způsobu objednávání

Výrobek	Obsah	Kat. č.
Sada QIAamp DSP DNA FFPE Tissue – pro čištění genomové DNA z tkání zalitých v parafínu		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Na 50 preparátů s DNA: 50 kolonek QIAamp MinElute®, proteináza K, pufrý, promývací zkumavky (2 ml), eluční zkumavky (1,5 ml), lyzační zkumavky (2 ml)	60404

Aktuální licenční informace a právní doložky specifické pro produkty viz příslušná příručka sady QIAGEN nebo uživatelská příručka. Příručky k sadám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na stránkách **www.qiagen.com** nebo si je lze vyžádat od technických služeb společnosti QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (skupina QIAGEN); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Omezené licenční ujednání pro příručku k sadě QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

Použitím produktu vyjadřuje kupující nebo uživatel tohoto produktu souhlas s následujícími podmínkami:

1. Tento produkt může být používán pouze v souladu s protokoly, které jsou součástí produktu a této příručky a pouze pro použití s komponenty obsaženými v panelu. Společnost QIAGEN neposkytuje žádnou licenci svých duševních práv k používání nebo začlenění součástí, které jsou obsaženy v tomto panelu, společně s kterýmikoliv součástmi, které nejsou v tomto panelu obsaženy, s výjimkou případů popsanych v této příručce a dalších protokolech dostupných na stránkách www.qiagen.com. Některé z těchto doplňujících protokolů byly poskytnuty uživateli výrobků QIAGEN pro jiné uživatele výrobků QIAGEN. Tyto protokoly nebyly společností QIAGEN podrobně testovány ani optimalizovány. Společnost QIAGEN nezaručuje ani neposkytuje záruku na to, že neporušují práva třetích stran.
2. Společnost QIAGEN neposkytuje jiné než výslovně uvedené licence a neposkytuje žádné záruky, že daný panel či jeho užívání neporušuje práva třetích stran.
3. Tento panel a jeho součásti jsou licencovány jen k jednorázovému použití a je zakázáno je znovu používat, renovovat nebo znovu prodávat.
4. Společnost QIAGEN výslovně odmítá jakékoli jiné licence, výslovně nebo předpokládané, než ty, které jsou zde výslovně uvedeny.
5. Kupující a uživatel tohoto panelu souhlasí s tím, že neposkytne a nepovolí nikomu jinému provádět žádné kroky, které by mohly vést nebo by usnadnily jakékoli shora zakázané činnosti. Společnost QIAGEN může prosazovat zákazy tohoto ujednání o omezené licenci u kteréhokoliv soudu, a bude vyžadovat kompenzaci za veškeré náklady vynaložené na vyšetřování a soudní výlohy včetně poplatků za právní zástupce v případě jakéhokoliv soudního sporu s cílem prosadit toto ujednání o omezené licenci nebo kteréhokoliv ze svých práv k duševnímu vlastnictví v souvislosti s panelem nebo jeho součástmi.

Aktualizované licenční podmínky viz www.qiagen.com.

Únor-17 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky www.qiagen.com/contact | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com