

Manual de instrucciones de uso del RNeasy[®] DSP FFPE Kit



Versión 2

IVD

Para uso diagnóstico in vitro

Para su uso con el RNeasy DSP FFPE Kit

CE

REF

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania

R1 MAT

1127532ES

Contenido

Uso previsto	4
Usuario previsto	4
Descripción y principio.....	5
Resumen y explicación	5
Principios del procedimiento	6
Materiales suministrados	8
Contenido del kit.....	8
Componentes del kit	9
Materiales necesarios pero no suministrados	10
Advertencias y precauciones.....	11
Información de seguridad.....	11
Información para emergencias.....	12
Precauciones.....	12
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	14
Estabilidad en uso	14
Componentes del kit	14
Procedimiento	15
Cuestiones importantes antes de comenzar.....	15
Preparación de soluciones tampón	16
Antes de comenzar.....	17
Protocolo: Purificación de ARN total a partir de secciones de tejido FFPE.....	18
Control de calidad.....	23

Limitaciones	23
Características del rendimiento	24
Eliminación	25
Guía de resolución de problemas	26
Símbolos	29
Información de contacto	31
Apéndice: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN	32
Información para pedidos.....	35
Historial de revisiones del documento	36

Uso previsto

El RNeasy DSP FFPE Kit es un sistema diseñado para la purificación manual del ARN total de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE).

Implementa un protocolo optimizado basado en columnas de centrifugación de sílice e incluye la eliminación enzimática del ADN residual.

El RNeasy DSP FFPE Kit se ha diseñado para diagnóstico in vitro

Usuario previsto

El producto está concebido para que lo utilicen usuarios profesionales, como técnicos y médicos formados en técnicas de biología molecular.

Descripción y principio

Resumen y explicación

El RNeasy DSP FFPE Kit está especialmente diseñado para la purificación del ARN total de secciones de tejido fijadas en formalina e incluidas en parafina (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE). Al aislar moléculas de ARN de más de 70 nucleótidos, el kit proporciona la recuperación de fragmentos de ARN utilizables para aplicaciones como RT-PCR.

Debido a las condiciones de fijación e inclusión, los ácidos nucleicos de las muestras FFPE suelen fragmentarse y modificarse químicamente con formaldehído. Por lo tanto, los ácidos nucleicos aislados de muestras FFPE normalmente presentan un peso molecular inferior a los obtenidos de muestras frescas o congeladas. El grado de fragmentación depende del tipo y de la antigüedad de la muestra, así como de las condiciones de fijación, inclusión y almacenamiento. Para la estandarización de los procesos previos al análisis para tejidos FFPE, recomendamos proceder de acuerdo con la norma ISO 20166-1:2018 «Examen de diagnóstico molecular in vitro. Especificaciones para los procesos preanalíticos para tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE). Parte 1: ARN aislado».

Aunque la modificación del formaldehído no se puede detectar en los ensayos de control de calidad estándar, como la electroforesis en gel o el análisis lab on a chip, interfiere firmemente con los análisis enzimáticos.

Aunque el RNeasy DSP FFPE Kit está optimizado para revertir la mayor cantidad posible de modificaciones de formaldehído sin degradar más el ARN, los ácidos nucleicos purificados a partir de muestras FFPE no deben usarse en aplicaciones posteriores que requieren ARN de longitud completa. Algunas aplicaciones pueden requerir modificaciones para permitir el uso de ARN fragmentado (por ejemplo, el diseño de pequeños amplicones para RT-PCR). Para la síntesis de ADNc, deben usarse cebadores aleatorios o específicos de genes en lugar de cebadores de oligo-dT.

La tinción de secciones FFPE también puede afectar la calidad y el rendimiento del ARN en aplicaciones posteriores. Esto se aplica en especial a muchos protocolos de tinción inmunohistoquímica.

Principios del procedimiento

El procedimiento RNeasy DSP FFPE utiliza la consolidada tecnología RNeasy para la purificación de ARN. Las condiciones de lisis especialmente optimizadas permiten purificar eficazmente el ARN total a partir de secciones de tejido FFPE. El paso de digestión de la ADNasa I elimina eficazmente la contaminación del ADN, incluyendo las moléculas muy fragmentadas.

En primer lugar, se elimina toda la parafina de las secciones de tejido FFPE mediante el tratamiento con Deparaffinization Solution. A continuación, las muestras se incuban en un tampón de lisis optimizado, que contiene proteinasa K para liberar el ARN de las secciones. Una incubación breve a una temperatura más alta revierte parcialmente la reticulación de formalina de los ácidos nucleicos liberados, mejorando el rendimiento y la calidad del ARN, así como su rendimiento en los ensayos anterógrados enzimáticos. A esto le sigue el tratamiento con ADNasa I, optimizado para eliminar el ADN genómico, incluyendo fragmentos de ADN muy pequeños a menudo presentes en las muestras FFPE después de una fijación prolongada en formalina o tiempos de almacenamiento prolongados. A continuación, el lisado se mezcla con Buffer RBC. Se agrega etanol para proporcionar las condiciones de unión apropiadas para el ARN, y luego la muestra se aplica a una RNeasy MinElute Spin Column, donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes se eliminan eficazmente mediante lavado. A continuación, se eluye el ARN en un mínimo de 14 µl de agua libre de ARNasa.

Procedimiento con RNeasy DSP FFPE

Secciones de tejido FFPE

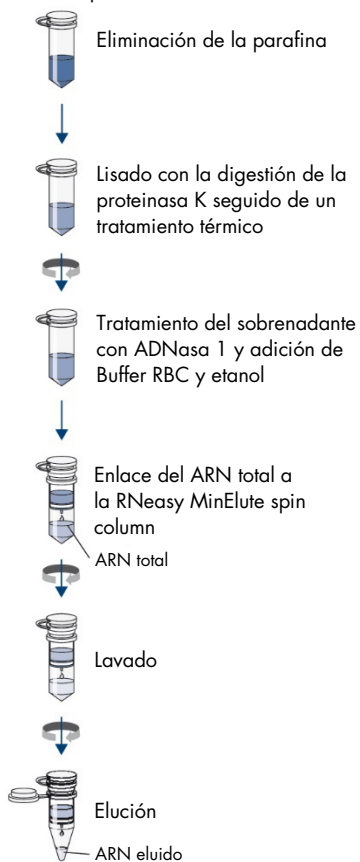


Figura 1. Procedimiento de purificación de ARN a partir de tejido FFPE utilizando el RNeasy DSP FFPE Kit.

Materiales suministrados

Contenido del kit

RNeasy DSP FFPE Kit	(50)
N.º de catálogo	73604
Número de preparaciones	50

	Denominación	Símbolos	Cantidad
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (rosa) (cada una en un tubo de recogida de 2 ml)	COL	50
ET	Elution Tubes (Tubos de elución) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lisis) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Tubos de lavado) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (Proteinasa K)	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (ADNasa I libre de ARNasa) (liofilizada)	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (Agua libre de ARNasa)	ELU DIL	3 × 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE [†] (Tampón RPE) (concentrado)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v2	Manual de uso del RNeasy DSP FFPE Kit		1

* Contiene una sal de guanidina. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 11 si desea obtener información de seguridad.

[†] Antes de utilizarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (96-100 %, no desnaturalizado), tal como se indica en la botella y se describe en la página 16 para obtener una solución de trabajo.

Componentes del kit

Los componentes principales del kit se explican a continuación.

Tabla 1. Reactivos suministrados que contienen ingredientes activos

Reactivo		Componentes	Volumen
Símbolo	Nombre		
DPS	Deparaffinization Solution	Hexadecano	≥90 % a ≤100 % p/p
RBC	Buffer RBC	Clorhidrato de guanidina	≥30 % a 70 % p/p
PKD	Buffer PKD	Ninguno	–
PK	Proteinase K (Proteinasa K)	Proteinasa K	≥1 % a <3 % p/p
DN	RNase-Free DNase I (ADNasa I libre de ARNasa) (liofilizada)	ADNasa	≥90 % a ≤100 % p/p
RNFW	RNase-Free Water (Agua libre de ARNasa)	Ninguno	–
DBB	DNase Booster Buffer	Ninguno	–
RPE	Buffer RPE (Tampón RPE) (concentrado)	Ninguno	–

Para reducir al mínimo el riesgo de que se produzcan efectos negativos sobre los resultados diagnósticos generados después del aislamiento del ARN, deben utilizarse controles apropiados para las aplicaciones posteriores.

Materiales necesarios pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de protección. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

Asegúrese de que los instrumentos se hayan verificado y calibrado siguiendo las recomendaciones del fabricante.

- Puntas de pipeta y pipetas estériles y libres de ARNasa
- Microcentrifugadora (con rotor para tubos de 2 ml)
- Agitador vorticial
- Etanol al 96–100 % (no utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona)
- Guantes desechables
- Bloque calefactor con función de agitación capaz de incubar a 56 °C y 80 °C

Advertencias y precauciones

Tenga en cuenta que puede ser necesario que tenga que consultar las normativas locales para conocer los requisitos de notificación, en relación a los sucesos graves que hayan ocurrido en relación con el dispositivo; al fabricante y a la autoridad sanitaria del país en el que resida el usuario y/o el paciente.

Todas las mitigaciones previstas se implementaron cuando fue posible en esta etapa de desarrollo del producto y se revisaron sistemáticamente. Según la gestión de riesgos, el riesgo residual general se considera aceptable y el uso del dispositivo se considera seguro. No existen riesgos residuales en el RNeasy DSP FFPE Kit.

Para uso diagnóstico in vitro.

Lea atentamente todas las instrucciones antes de utilizar el kit.

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de protección. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.

ADVERTENCIA Riesgo de lesiones personales



NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de muestras.

Los tampones del RNeasy DSP FFPE Kit contienen azida sódica. Si se derraman tampones de los kits, límpielos con un detergente de laboratorio adecuado y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie primero la zona afectada con detergente de laboratorio y agua y, a continuación, con hipoclorito sódico al 1 % (v/v).

Información para emergencias

CHEMTREC

EE.UU. y Canadá 1-800-424-9300

Fuera de EE.UU. y Canadá +1 703-527-3887

Precauciones

Las siguientes frases relativas a los riesgos y a las medidas de precaución se aplican a los componentes del RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNF, DBB

Contiene: Azida sódica. ¡Advertencia! Puede ser nocivo por ingestión. Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico en caso de malestar.

Deparaffinization Solution



Contiene: hexadecano. ¡Peligro! Puede ser mortal en caso de ingestión y penetración en las vías respiratorias. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Puede irritar las vías respiratorias. Puede causar efectos nocivos duraderos para los organismos acuáticos. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. NO provocar el vómito. Consérvese bajo llave. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado.

Proteinase K



Contiene: Proteinase K. ¡Peligro! Causa irritación leve de la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. Llevar equipo de protección respiratoria. EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. Transporte a la persona al exterior y manténgala en reposo en una posición cómoda para respirar. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado.

DNase I



Contiene: ADNasa. ¡Peligro! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. Llevar equipo de protección respiratoria. En caso de exposición manifiesta o presunta: Llamar a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. Transporte a la persona al exterior y manténgala en reposo en una posición cómoda para respirar.

Buffer RBC



Contiene: clorhidrato de guanidina. ¡Advertencia! Nocivo en caso de ingestión o inhalación. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

DNase Booster Buffer



¡Advertencia! Causa irritación leve de la piel. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

La ADNasa I libre de ARNasa y las MinElute spin columns deben almacenarse a 2-8 °C inmediatamente después de su recepción. Los tampones pueden guardarse a temperatura ambiente (15-25 °C). Bajo estas condiciones, el kit se puede almacenar según lo indicado por la fecha de caducidad en la etiqueta de la caja sin ninguna reducción en el rendimiento.

No utilice el RNeasy DSP FFPE Kit si ha caducado.

Estabilidad en uso

El kit puede utilizarse durante 10 meses después de su primer uso o hasta la fecha de caducidad.

Componentes del kit

Las fechas de caducidad de cada reactivo figuran en las etiquetas de cada componente. En las condiciones de almacenamiento adecuadas, el producto mantendrá su rendimiento durante el período de estabilidad siempre que se utilicen los mismos lotes de componentes.

Para el almacenamiento a largo plazo de la ADNasa I después de la reconstitución, retire la solución madre del vial, divídala en alícuotas de un solo uso y guárdela entre -15 y -30 °C durante un máximo de 10 meses. Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a 2-8 °C durante un máximo de 8 semanas. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.

Evite la exposición de los reactivos a la luz UV (p. ej., utilizada para la descontaminación), ya que dicha exposición puede causar un envejecimiento acelerado.

Procedimiento

Cuestiones importantes antes de comenzar

Material inicial

La fijación con formalina y los procedimientos de incorporación en parafina convencionales provocan siempre una fragmentación y una reticulación significativas de los ácidos nucleicos. Para limitar el grado de fragmentación y reticulación de los ácidos nucleicos, asegúrese de lo siguiente:

- Utilice muestras de tejido de menos de 5 mm de espesor para permitir la penetración completa de la formalina
- Fije las muestras de tejido con formalina tamponada neutra del 4 al 10 % tan rápido como sea posible tras la extracción quirúrgica
- Aplique un tiempo de fijación máximo de 24 horas (los tiempos de fijación superiores producen una fijación excesiva y una fragmentación más intensa del ácido nucleico, provocando un rendimiento deficiente en los ensayos anterógrados)
- Deshidrate completamente las muestras antes del proceso de inclusión
- Use parafina de baja fusión para la inclusión

El material de partida para la purificación del ARN debe ser secciones cortadas de tejido FFPE, con un grosor de hasta 20 μm cada una. Las secciones más gruesas pueden dar como resultado rendimientos de ácido nucleico más bajos, incluso después de una incubación prolongada con proteinasa K. En una preparación se pueden combinar hasta 4 secciones, cada una con un grosor de hasta 10 μm . Se pueden combinar más de 4 secciones si la suma total del grosor de las secciones es de 40 μm o menos (por ejemplo, ocho secciones de 5 μm de grosor).

Para tejidos con un contenido de ADN particularmente alto, recomendamos utilizar menos secciones por preparación para evitar la contaminación con ADN del ARN purificado.

Si no hay información acerca de la naturaleza de su material de partida, le recomendamos que comience con no más de 2 secciones en cada preparación. En función del rendimiento y de la pureza del ARN es posible utilizar un máximo de 4 secciones en las preparaciones subsiguientes. Sin embargo, la sobrecarga de la RNeasy MinElute spin column podría reducir significativamente el rendimiento y la calidad del ARN.

Preparación de soluciones tampón

Preparación de la solución madre de ADNasa I

Prepare la solución madre de ADNasa I disolviendo la ADNasa I liofilizada en 550 µl de agua libre de ARNasa. Para evitar la pérdida de ADNasa I, no abra el vial. Inyecte agua libre de ARNasa en el vial con una aguja y una jeringa libre de ARNasa. Mezcle suavemente invirtiendo el vial. No la agite en la agitadora vorticial.

En algunos casos, el vial de ADNasa I puede parecer vacío. Esto se debe a que la enzima liofilizada se adhiere al septo. Para evitar la pérdida de ADNasa I, no abra el vial. En su lugar, disuelva la ADNasa I con una aguja y una jeringa como se describe a continuación.

Nota: La ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el vial con suavidad.

Nota: Asegúrese de inyectar el volumen completo de agua libre de ARNasa en el vial.

Puede quedar material insoluble después de disolver la ADNasa I. Debido al proceso de producción, puede haber material insoluble presente en la ADNasa I liofilizada. Esto no afecta a su rendimiento.

Para el almacenamiento a largo plazo de ADNasa I, extraiga la solución madre del vial, divídala en alícuotas de un solo uso y guárdela entre -15 y -30 °C durante un máximo de 10 meses. Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a $2-8$ °C durante un máximo de 8 semanas. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.

Preparación del Buffer RPE

Añada 4 volúmenes (44 ml) de etanol (96-100 %) al frasco que contiene 11 ml de Buffer RPE concentrado. Marque la casilla de verificación de la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido etanol.

Nota: Antes de comenzar el procedimiento, mezcle el Buffer RPE reconstituido mediante agitación.

Antes de comenzar

- Si está utilizando el RNeasy DSP FFPE Kit por primera vez, lea «Cuestiones importantes antes de comenzar» (página 15)
- Si va a trabajar con ARN por primera vez, lea «Apéndice: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN» (página 31).
- El Buffer RBC contiene sal de guanidina y, por lo tanto, no es compatible con reactivos desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 11 si desea obtener información de seguridad.
- A menos que se especifique lo contrario, realice todos los pasos del procedimiento a temperatura ambiente ($15-25$ °C). Durante el procedimiento, trabaje con rapidez y no se detenga.
- Realice todos los pasos de centrifugación utilizando una microcentrifugadora entre 15 y 25 °C. Si va a utilizar una microcentrifugadora refrigerada, establezca la temperatura entre 20 y 25 °C; de lo contrario, puede producirse un enfriamiento importante por debajo de los 15 °C.

- En el siguiente procedimiento, ▲ indica los volúmenes a utilizar si se procesan 1 o 2 secciones por muestra, mientras que ● indica los volúmenes a utilizar si se procesan 3 o 4 secciones por muestra.
- Si utiliza Buffer RPE y ADNasa I libre de ARNasa por primera vez, reconstitúyalos como se describe en «Preparación de soluciones tampón» (página 16).
- Equilibre todos los tampones a temperatura ambiente (15-25 °C). Mezcle el tampón RPE reconstituido mediante agitación.
- Ajuste el mezclador térmico a 56 °C para su uso en los pasos 5 y 9. Para reducir el tiempo de espera, ajuste un segundo mezclador térmico a 80 °C para su uso en el paso 9.
- Nota: No interrumpa el procedimiento de purificación, puesto que el aumento de los tiempos de incubación puede conllevar la pérdida o degradación del ARN. La media del tiempo de procesamiento de hasta 12 muestras en paralelo es de aproximadamente 130 minutos.

Protocolo: Purificación de ARN total a partir de secciones de tejido FFPE

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.
2. Corte secciones de 5-20 µm de grosor.
Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine las primeras 2 a 3 secciones.
3. Coloque inmediatamente las secciones en un tubo de microcentrifugadora de ▲ 1,5 ml o ● 2 ml y cierre la tapa.
4. Añada ▲ 160 µl o ■ 320 µl de Deparaffinization Solution, agite en vórtex con fuerza durante 10 segundos y centrifugue brevemente para llevar la muestra al fondo del tubo.
5. Incube a 56 °C durante 3 minutos y luego deje enfriar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Si se usa muy poca Deparaffinization Solution o si se transfiere demasiada parafina con la muestra, la Deparaffinization Solution puede volverse cerosa o sólida tras enfriarse. Si

esto ocurre, agregue más Deparaffinization Solution en disposiciones de 160 µl y repita el paso 5.

6. Añada ▲ 150 µl o ● 240 µl de Buffer PKD y mezcle mediante agitación vorticial durante 3 segundos.
7. Centrifugue durante 1 minuto a 11000 x g.
8. Añada 10 µl de proteinasa K a la fase inferior y transparente y mezcle pipeteando suavemente 10 veces hacia arriba y abajo (no mezcle las fases separadas).
9. Incube a 56 °C durante 15 minutos a 1100 rpm, luego a 80 °C durante 15 minutos a 1100 rpm.

Si emplea un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56 °C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 80 °C.

Nota: No se requiere la digestión completa del tejido por la proteinasa K para obtener el máximo rendimiento de ARN; sin embargo, el paso de incubación a 80 °C es fundamental.

Importante: Asegúrese de que el bloque calefactor haya alcanzado los 80 °C antes de iniciar la incubación de 15 minutos. Los 15 minutos de incubación a 80 °C son fundamentales para la reversión de las reticulaciones de formaldehído y el rendimiento óptimo del ARN en aplicaciones posteriores como la real-time RT-PCR.

10. Centrifugue brevemente y transfiera ▲ 145 µl o ● 230 µl de la fase inferior transparente a un nuevo tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml.
11. Incube en hielo durante 3 minutos. Luego, centrifugue durante 15 minutos a 20 000 x g.
12. Transfiera el sobrenadante a una nueva microcentrifugadora de 2 ml, con cuidado de no alterar el sedimento.

El sedimento contiene restos de tejido insolubles, incluido el ADN reticulado.

13. Añada DNase Booster Buffer equivalente a una décima parte del volumen total de la muestra (▲ 14,5 o ● 23 µl) y 10 µl de solución madre de ADNasa I. Mezcle invirtiendo el tubo. Centrifugue brevemente para que el líquido residual de los lados del tubo se deposite.

Nota: La ADNasa I se suministra liofilizada y debe reconstituirse como se describe en «Preparación de la solución madre de ADNasa I», página 16.

Nota: La ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el tubo con suavidad. No la agite en la agitadora vorticial.

14. Incube a temperatura ambiente durante 15 minutos.
15. Añada ▲ 320 µl o ● 500 µl de Buffer RBC para ajustar las condiciones de unión y mezcle bien el lisado mediante agitación vorticial durante 3 segundos y centrifugue brevemente.
16. Añada ▲ 720 µl o ■ 1200 µl de etanol (96-100 %) a la muestra. No centrifugue la mezcla. Continúe de inmediato con el paso 17.
Los precipitados pueden ser visibles después de añadir el etanol. Esto no afecta al procedimiento.
17. Mezcle bien pipeteando 5 veces hacia arriba y abajo y transfiera 700 µl de la muestra, incluyendo cualquier precipitado que pueda haberse formado, a una RNeasy MinElute spin column colocada en un tubo de recogida de 2 ml. Cierre la tapa con cuidado y centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Deseche el tubo de recogida con el filtrado* y coloque la columna en un nuevo tubo de recogida (suministrado).
18. Repita el paso 17 (sin seguir mezclando) hasta que toda la muestra haya pasado por la RNeasy MinElute spin column.
19. Añada 500 µl de Buffer RPE a la RNeasy MinElute spin column. Cierre la tapa con cuidado y centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Deseche el tubo de recogida con el filtrado* y coloque la columna en un nuevo tubo de recogida (suministrado).
Nota: El Buffer RPE se suministra como concentrado. Asegúrese de añadir etanol antes del uso como se describe en «Preparación del Buffer RPE».

* El filtrado contiene Buffer RBC, por lo que no es compatible con la lejía. Consulte la página 8 si desea obtener información de seguridad.

20. Añada 500 µl de Buffer RPE a la RNeasy MinElute spin column. Cierre la tapa con cuidado y centrifugue durante 2 minutos a $\geq 8000 \times g$ para lavar la membrana de la columna de centrifugación. Deseche el tubo de recogida con el filtrado* y coloque la columna en un nuevo tubo de recogida (suministrado).

Nota: Después de la centrifugación, retire con cuidado la RNeasy MinElute spin column del tubo de recogida para que no entre en contacto con el filtrado. De lo contrario, se podría producir una contaminación por arrastre de etanol.

21. Abra la tapa de la columna de centrifugación y centrifugue a máxima velocidad durante 5 minutos. Deseche el tubo de recogida con el filtrado.

Para evitar el deterioro de las tapas, sitúe las columnas de centrifugación en la centrífuga con al menos una posición vacía entre las columnas. Coloque las tapas de modo que estén orientadas hacia la dirección opuesta a la rotación del rotor (p. ej., si el rotor gira en el sentido de las agujas del reloj, oriente las tapas en sentido antihorario).

Es importante secar la membrana de la columna de centrifugación puesto que los restos de etanol pueden interferir en las reacciones posteriores. Centrifugar con las tapas abiertas evita el arrastre de etanol durante la elución de ARN.

22. Sitúe la RNeasy MinElute spin column en un tubo de recogida de 1,5 ml nuevo (suministrado). Añada 14-32 µl de agua libre de ARNasa directamente en el centro de la membrana de la columna de centrifugado. Cierre la tapa con suavidad y centrifugue durante 1 minuto a máxima velocidad para eluir el ARN.

La elución con volúmenes más pequeños de agua libre de ARNasa lleva a concentraciones de ARN total más altas, pero a rendimientos de ARN más bajos.

Nota: Para las muestras en las que se espera ARN bajo, se recomienda utilizar un tubo de baja unión para elución (no suministrado). El volumen muerto medio de la RNeasy

* El filtrado contiene Buffer RBC, por lo que no es compatible con la lejía. Consulte la página 8 si desea obtener información de seguridad.

MinElute spin column es de 2 µl: la elución con 14 µl de agua libre de ARNasa da como resultado aproximadamente 12 µl de eluido.

23. Almacene los eluidos de ARN a una temperatura de -60 a -90 °C o de -15 a -30 °C durante un máximo de 12 semanas.

Nota: La estabilidad del eluido dependerá del contenido y del tipo de ARN aislado, del volumen de elución y de las condiciones de almacenamiento. Recomendamos que los usuarios determinen la estabilidad del eluido según sus requisitos particulares.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote de RNeasy DSP FFPE Kit se analiza a partir de las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Limitaciones

El rendimiento del sistema se ha establecido en estudios de evaluación del rendimiento que purifican ARN humano a partir de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no esté cubierto por los estudios de evaluación del rendimiento de QIAGEN.

Para reducir al mínimo el riesgo de que se produzcan efectos negativos sobre los resultados diagnósticos, deben utilizarse controles apropiados para las aplicaciones posteriores.

Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros datos clínicos o de laboratorio.

Características del rendimiento

Encontrará las características de rendimiento aplicables en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com.

Eliminación

Los residuos contienen muestras y reactivos. Estos residuos pueden contener material tóxico o infeccioso y deben eliminarse adecuadamente. Consulte la normativa local en materia de seguridad para conocer los procedimientos de eliminación adecuados.

Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos de seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y/o los protocolos de este manual de uso, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

RNeasy MinElute spin column obstruida

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Demasiado material de partida | Reduzca la cantidad de material de partida. Es fundamental utilizar la cantidad correcta de material de partida (ver página 15). |
| b) | Temperatura de centrifugado demasiado baja | La temperatura de centrifugado debe ser de 15 a 25 °C. Algunas centrifugas pueden enfriarse por debajo de los 15 °C incluso si se configuran a 20 °C. Esto puede causar la formación de precipitados que pueden obstruir la RNeasy MinElute spin column. Si esto ocurre, configure la temperatura de centrifugado a 25 °C. |

Baja cantidad obtenida de ARN

- | | | |
|----|---|--|
| a) | Mala calidad del material de partida | Las muestras que se fijaron durante más de 24 horas o se almacenaron durante períodos muy prolongados pueden contener muy poco ARN utilizable.

Las secciones que se montaron sobre portaobjetos de microscopio pueden producir muy poco ARN utilizable debido a la exposición prolongada al aire. |
| b) | Demasiado material de partida | La sobrecarga de la RNeasy MinElute spin column reduce significativamente la producción de ácidos nucleicos. Reduzca la cantidad de material de partida (consulte la página 15). |
| c) | ARN todavía unido a la membrana de la RNeasy MinElute spin column | Repita la elución de ARN, pero incube la RNeasy Min Elute spin column en la mesa durante 10 minutos con agua libre de ARNasa (RNFW) antes de la centrifugación. |

Comentarios y sugerencias

- d) Almacenamiento incorrecto de tampones/reactivos
- Las RNeasy MinElute spin columns, así como la ADNasa I, deben almacenarse a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C tras la recepción el kit. Compruebe la temperatura de almacenamiento correcta, ya que la exposición a temperaturas más altas durante períodos prolongados puede provocar la pérdida de funcionalidad.
-

Valor A_{260}/A_{280} bajo

- Se ha utilizado agua para diluir el ácido nucleico para medir el cociente A_{260}/A_{280}
- Use tampón 10 mM Tris Cl con un pH de 7,5, y no agua, para diluir la muestra antes de medir la pureza.
-

Contaminación de ADN en experimentos posteriores








- a) Demasiado material de partida
- En algunos tipos de tejidos, la eficiencia de la eliminación de ADN puede reducirse cuando se procesan cantidades muy altas. Si el ARN eluido contiene una contaminación sustancial con ADN, intente procesar menos secciones de tejido por preparación.
- b) El tejido tiene un alto contenido de ADN
- Cuando se procesan cantidades muy grandes de tejidos ricos en ADN (p. ej., timo), es posible que el ADN no se digiera por completo. Repita el procedimiento de purificación utilizando menos secciones de tejido.
- Compruebe si la ADNasa I se ha almacenado correctamente como se describe en «Almacenamiento y manipulación de reactivos» y «Preparación de la solución madre de ADNasa I».
- c) Transcripción inversa con cantidad insuficiente de ARN
- La mayoría de las transcriptasas inversas están diseñadas para usarse con aproximadamente 1 µg de ARN. Si realiza la transcripción inversa con cantidades muy pequeñas de ARN, recomendamos utilizar una transcriptasa inversa que esté especialmente diseñada para transcripciones inversas de alta sensibilidad.
-









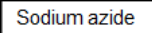

El ARN no tiene un buen rendimiento en ensayos/aplicaciones anterógrados

- | | |
|---|--|
| a) ARN fragmentado o bloqueado debido a la alteración por el formaldehído | <p>La incubación a 80 °C en el procedimiento RNeasy DSP FFPE es fundamental para un rendimiento óptimo del ARN en la transcripción inversa y otras aplicaciones enzimáticas posteriores. Asegúrese de que la temperatura de incubación se mantenga a 80 °C durante los 15 minutos de incubación.</p> <p>Aunque la incubación a 80 °C elimina algunas de las alteraciones por el formaldehído, el ARN purificado a partir de las secciones FFPE no es un molde óptimo para las reacciones enzimáticas. Recomendamos usar solo cebadores aleatorios o específicos para los genes para la síntesis de ADNc. También recomendamos mantener los amplicones lo más cortos posible para PCR (< 500 nucleótidos).</p> |
| b) Arrastre de etanol | <p>Durante el segundo lavado con Buffer RPE, asegúrese de centrifugar a $\geq 8000 \times g$ durante 2 minutos a 15-25 °C para secar la membrana de la RNeasy MinElute spin column. Después de la centrifugación, retire con cuidado la columna del tubo de recogida para que no entre en contacto con el filtrado. Luego, coloque la columna en un tubo de recogida nuevo y centrifugue a máxima velocidad durante 5 minutos.</p> |
| c) Arrastre de sal durante la elución de ARN | <p>Asegúrese de que el Buffer RPE se haya reconstituido agregando el volumen correcto de etanol y que el tampón esté a temperatura ambiente (15-25 °C).</p> |
| d) Transcripción inversa con cantidad insuficiente de ARN | <p>La mayoría de las transcriptasas inversas están diseñadas para usarse con aproximadamente 1 μg de ARN. Si realiza la transcripción inversa con cantidades muy pequeñas de ARN, recomendamos utilizar una transcriptasa inversa que esté especialmente diseñada para transcripciones inversas de alta sensibilidad.</p> |

Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado aparecen los siguientes símbolos:

Símbolo	Definición del símbolo
 Σ <N>	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Este producto cumple los requisitos del reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	A su recepción
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material (es decir, etiquetado de los componentes)
	Componentes (lista de los elementos incluidos)

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene (contenido)
	Número (es decir, viales, frascos)
	Número mundial de artículo comercial
Rn	"R" es la revisión del Manual de instrucciones de uso y "n" es el número de revisión
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso
	Precaución
	Proteinasa K
	Azida sódica
	Identificador único de dispositivo

Información de contacto

Para recibir asistencia técnica y solicitar más información, visite nuestro Centro de servicio técnico en el sitio www.qiagen.com/Support, llame al 00800-22-44-6000 o póngase en contacto con uno de los departamentos del servicio técnico de QIAGEN o con los distribuidores locales (consulte la contraportada o visite www.qiagen.com).

Apéndice: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN

Manipulación del ARN

Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas muy estables y activas que, en general, no requieren cofactores para actuar. Dado que las ARNasas son difíciles de inactivar y que se necesitan solamente cantidades minúsculas para destruir el ARN, no utilice ningún material de plástico o de vidrio sin eliminar antes una posible contaminación con ARNasa. Deben extremarse las precauciones para evitar introducir accidentalmente ARNasas en la muestra de ARN durante el procedimiento de purificación o después de este. Para crear y mantener un entorno libre de ribonucleasa, durante el tratamiento previo y el uso de los recipientes desechables y no desechables y de las soluciones deben adoptarse las siguientes medidas de precaución mientras se trabaja con el ARN.

Manipulación general

Siempre que se trabaje con ARN debe utilizarse una técnica aséptica microbiológica adecuada. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos y constituyen las fuentes más frecuentes de contaminación con ARNasa. Al manipular los reactivos y las muestras de ARN, use siempre guantes de látex o de vinilo para prevenir la contaminación con ARNasa procedente de la superficie de la piel o de un equipo de laboratorio con polvo. Cámbiese los guantes con frecuencia y mantenga los tubos cerrados siempre que sea posible. Mantenga el ARN purificado en hielo cuando pipetee las alícuotas para aplicaciones posteriores.

Para eliminar la contaminación con ARNasa de las superficies de la mesa de trabajo, el material de plástico no desechable y el equipo de laboratorio (p. ej., pipetas y tanques de electroforesis), se recomienda el uso de RNaseZap® (n.º de cat. AM9780) de Ambion®.

Alternativamente, la contaminación con ARNasa se puede eliminar utilizando reactivos de laboratorio genéricos. Para descontaminar materiales de plástico, enjuague con NaOH 0,1 M, EDTA 1 mM seguido de agua libre de ARNasa (consulte «Soluciones», página 33) o enjuague con cloroformo si los materiales de plástico son resistentes al cloroformo. Para descontaminar los tanques de electroforesis, límpielos con detergente (p. ej., SDS al 0,5 %), enjuague con agua libre de ARNasa, enjuague con etanol (si los tanques son resistentes al etanol) y permita que se sequen.

Materiales de plástico desechable

Se recomienda usar tubos de polipropileno estériles durante todo el procedimiento. Estos tubos generalmente no contienen ARNasas y no requieren de un tratamiento previo para inactivar las ARNasas.

Materiales de vidrio

Antes de usarse, los materiales de vidrio deben tratarse para garantizar que están libres de ARNasa. Antes de usarse, los materiales de vidrio utilizados para trabajar con ARN deben limpiarse con detergente, enjuagarse meticulosamente y calentarse en el horno a una temperatura de 240 °C durante cuatro horas o más (si se prefiere, durante la noche). El autoclave por sí solo no inactivará totalmente muchas ARNasas. Alternativamente puede tratar los materiales de vidrio con DEPC (dietilpirocarbonato) como se describe a continuación en «Soluciones».

Soluciones

Las soluciones (agua y otras soluciones) se deben tratar con DEPC al 0,1 %. El DEPC es un inhibidor potente, pero no absoluto, de las ARNasas. Se utiliza habitualmente a una concentración del 0,1 % para inactivar las ARNasas en materiales de vidrio o de plástico o para preparar soluciones y agua sin ARNasas. El DEPC inactiva las ARNasas por medio de una modificación covalente. Añada 0,1 ml de DEPC a 100 ml de la solución a tratar y agite enérgicamente para que se disuelva. Incube la solución durante 12 horas a 37 °C. Esterilice

en autoclave durante 15 minutos para eliminar cualquier resto de DEPC. El DEPC reaccionará con las aminas primarias y no puede utilizarse directamente para tratar los tampones Tris. El DEPC es altamente inestable en presencia de tampones Tris y se descompone rápidamente en etanol y CO₂. Cuando prepare tampones Tris, en primer lugar trate el agua con DEPC y, a continuación, disuelva el Tris para preparar el tampón adecuado. Las cantidades residuales de DEPC modificarán los residuos de purinas en el ARN por medio de una carbetoxilación. El ARN carbetoxilado se convierte con una eficacia muy baja en sistemas libres de células. No obstante, su capacidad de formar híbridos de ADN:ARN o ARN:ARN no se ve seriamente afectada, salvo que se haya modificado una gran fracción de residuos de purinas. El DEPC residual siempre se debe eliminar de las soluciones o de los recipientes en el autoclave o calentándolos a 100 °C durante 15 minutos.

Nota: Los tampones RNeasy están garantizados libres de ARNasa sin utilizar el tratamiento de DEPC y, por consiguiente, estos no presentan ninguna contaminación por DEPC.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Columns, tubos de elución, tubos de lavado y tubos de lisis, y reactivos y tampones libres de ARNasa	73604

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R1, junio de 2022	<p>Actualice a la versión 2 del kit para el cumplimiento con el IVDR.</p> <p>Sin cambios en los protocolos o el rendimiento en comparación con la versión 1 del kit</p> <p>Actualización de Advertencias y Precauciones (adición de riesgos residuales e información de emergencia)</p> <p>Adición de la sección Eliminación</p>

Acuerdo de licencia limitada para el RNeasy DSP FFPE Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este kit con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
1. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este kit y/o su uso no infrinjan los derechos de terceros.
2. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
3. QIAGEN renuncia específicamente a toda responsabilidad respecto a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
4. El comprador y el usuario del kit aceptan no llevar a cabo ni permitir que otros lleven a cabo medidas que puedan conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que puedan facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para obtener los términos de licencia actualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific o sus filiales). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc., utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación. 06/2022 HB-3027-001 1127532ES © 2022 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

