



Červen 2022

Návod k použití sady QIASymphony® DSP DNA Mini Kit (protokolový list)

Protokoly Tissue_LC_200_V7_DSP a Tissue_HC_200_V7_DSP

Verze 2



K diagnostickému použití in vitro

K použití se sadou QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)



937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Německo

R1

Protokol je k dispozici v elektronické podobě a najdete jej na produktové stránce v záložce zdroje na adrese www.qiagen.com.

Všeobecné informace

Sada QIASymphony DSP DNA Kit je určena k diagnostickým účelům in vitro.

Tyto protokoly jsou určeny k purifikaci celkové DNA z tkání a z tkání fixovaných formaldehydem a zatavených v parafínu (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded FFPE) pomocí QIASymphony SP a minisady QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

V závislosti na typu vzorku doporučujeme používat buď protokol pro nízký obsah (Low Content LC), nebo vysoký obsah (High Content HC). Tkáně budou dávat zvýšené výtěžky DNA, pokud budou zpracovávány protokolem vysokého obsahu, ale protokol nízkého obsahu v kombinaci s malým elučním objemem (50 µl) lze použít, pokud se vyžaduje vysoká koncentrace DNA. Pro tkáň FFPE doporučujeme použít protokol nízkého obsahu.

Protokol nízkého obsahu

| | |
|--|---|
| Sada | Minisada QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236) |
| Materiál vzorku | Tkáň FFPE a tkáň* Do jednoho přípravku lze kombinovat až 4 tkáňové řezy FFPE, každý o tloušťce až 10 µm, nebo 8 řezů o tloušťce až 5 µm a povrchové ploše až 250 mm ² . |
| Název protokolu | Tissue_LC_200_V7_DSP |
| Výchozí kontrolní sada analýzy | ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP |
| Eluční objem | 50 µl, 100 µl, 200 µl nebo 400 µl |
| Požadovaná verze softwaru | Verze 4.0 nebo vyšší |
| Požadovaná konfigurace softwaru k použití IVD | Výchozí profil 1 |

* Viz protokol vysokého obsahu, kde naleznete informace o tkáňových vzorcích.

Protokol vysokého obsahu

| | |
|--|--|
| Sada | Minisada QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. č. 937236) |
| Materiál vzorku | Tkáň Pokud nebude k dispozici žádná informace o očekávaném výtěžku, doporučujeme začít s 25 mg vzorku materiálu. V závislosti na získaném výtěžku lze zvětšit velikost vzorku u následných preparátů. |
| Název protokolu | Tissue_HC_200_V7_DSP |
| Výchozí kontrolní sada analýzy | ACS_TissueHLC_200_V7_DSP |
| Eluční objem | 50, 100, 200 nebo 400 µl |
| Požadovaná verze softwaru | Verze 4.0 nebo vyšší |
| Požadovaná konfigurace softwaru k použití IVD | Výchozí profil 1 |

Potřebné materiály, které nejsou součástí dodávky

Pro všechny typy vzorků

- Pufr Buffer ATL, 4 x 50 ml (kat. č. 939016)
- Postup minimalizace obsahu RNA: RNáza A zbavená DNázy (zásobní roztok 100 mg/ml)

Pro tkáň FFPE (deparafinizace bez použití xylenu)

- Deparafinizační roztok Deparaffinization Solution (kat. č. 939018)

Pro tkáň FFPE (deparafinizace pomocí xylenu)

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

Zásuvka „Sample“ (Vzorek)

| Typ vzorku | Tkáň FFPE a tkáň |
|------------------------------|--|
| Objem vzorku | 220 µl (vyžaduje se na vzorek, na protokol)* |
| Objem zpracovaného vzorku | 200 µl |
| Odběrové zkumavky vzorku | – |
| Zkumavky sekundárního vzorku | Další informace jsou uvedeny v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt pod záložkou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com . |
| Vložky | Další informace jsou uvedeny v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt pod záložkou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com . |

* U protokolů s vysokým i nízkým obsahem systém nerozpozná, pokud je objem vzorku menší než 220 µl, protože přenos vzorku se provádí bez detekce hladiny kapaliny. Proto se ujistěte, že vstupní objem vzorku je 220 µl.

– = neuváděno.

Zásuvka „Reagents and Consumables“ (Reagencie a spotřební materiál)

| Pozice A1 a/nebo A2 | Kazeta s reagensy (RC) |
|------------------------------------|--|
| Poloha B1 | – |
| Držák se stojánkem pro špičky 1–17 | Jednorázové filtrační špičky, 200 nebo 1500 µl |
| Držák boxu jednotky 1–4 | Jednotkové krabice obsahující kazety pro přípravu vzorků nebo 8-Rod Covers |

– = neuváděno.

* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako je metanol nebo methylethylketon.

Zásuvka „Waste“ (Odpad)

| | |
|------------------------------|--------------------------------|
| Držák boxu jednotky 1–4 | Prázdné jednotkové krabice |
| Držák odpadních sáčků | Odpadní sáček |
| Držák nádoby na tekutý odpad | Prázdna lahev na kapalný odpad |

Zásuvka „Eluate“ (Eluát)

Eluční stojánek (doporučujeme použít chladicí pozici, slot 1)

Další informace jsou uvedeny v seznamu laboratorního vybavení, který lze nalézt pod záložkou zdroje na produktové stránce na adrese www.qiagen.com.

Požadované plastové vybavení

| Plastové vybavení | Jedna šarže 24 vzorků* | Dvě šarže 48 vzorků* | Tři šarže 72 vzorků* | Čtyři šarže 96 vzorků* |
|----------------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 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 |

* Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet filtračních špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden běh.

† Jeden stojánek na špičky obsahuje 32 špiček s filtrem.

‡ Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 inventární sken na jeden RC.

§ V jednotkové krabici je 28 kazet pro přípravu vzorků.

¶ V jednotkové krabici je dvanáct 8-Rod Covers.

Poznámka: Udávaný počet filtračních špiček se liší od počtu zobrazeného na dotykové obrazovce v závislosti na nastaveních. Doporučujeme načíst maximální možný počet špiček.

Eluční objem

Eluční objem se vybírá na dotykové obrazovce. V závislosti na typu vzorku a obsahu DNA se může konečný objem změnit až o 15 µl směrem dolů vůči zvolenému objemu. Protože se eluční objem může měnit, doporučujeme zkontrolovat aktuální objem eluátu při používání systému automatického nastavení kvantitativní analýzy, který před přenosem neověřuje eluční objem. Eluce při nižších objemech zvyšuje konečnou koncentraci DNA, ale mírně snižuje výtěžnost. Doporučujeme používat eluční objem vhodný pro zamýšlenou aplikaci v dalších krocích.

Příprava materiálu vzorků

Při manipulaci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní pracovní oděv, jednorázové rukavice a ochranné brýle. Další informace si vyhledejte v příslušných bezpečnostních listech (BL) které obdržíte od dodavatele výrobku.

Obecná doporučení pro odběr, transport a skladování jsou uvedena ve schváleném pokynu CLSI MM13-A „Odběr, transport, příprava a skladování vzorků pro molekulární metody“.

Co je třeba udělat, než začnete

- Zkontrolujte pufr Buffer ATL, zda neobsahuje bílý precipitát. Bude-li to nezbytné, inkubujte 30 minut při 37°C za občasněmu protřepávání, aby se precipitát rozpustil.
- Nastavte termomixér nebo třepačku-inkubátor na teplotu vyžadovanou pro příslušné předběžnou úpravu.

Tkáně

Čerstvou a zmrazenou tkáň lze použít k purifikaci DNA. Výtěžnost a kvalita DNA závisí na typu tkáně, zdroji a podmínkách skladování. Čerstvou tkáň lze před zpracování rozřezat na malé kousky a uložit při –20°C nebo –80°C. Všeobecně doporučujeme použít protokol vysokého obsahu, který dává zvýšené výtěžky DNA. Protokol nízkého obsahu v kombinaci s elučním objemem 50 µl se doporučuje pouze v případě, že jsou v analýze při dalších krocích požadovány vysoké koncentrace DNA. Pokud nebudou k dispozici žádné informace o očekávaném výtěžku, doporučujeme začít s 25 mg materiálu vzorku s využitím protokolu vysokého obsahu a eluční objem 200 µl. V závislosti na získaném výtěžku lze u následných preparátů zvětšit velikost vzorku nebo zmenšit eluční objem. Nezapomeňte, že preparáty způsobující přetížení v kombinaci s malými elučními objemy mohou způsobit přenos magnetický částic do eluátu a mohly by narušit čistotu DNA a analýzu v dalších krocích.

Poznámka: Při práci se zmrazenými vzorky tkání je třeba vzít v úvahu normu ISO 20184-3:2021 (E) pro automatizovanou extrakci NA ze zmrazených vzorků tkání.

Poznámka: Stabilita alikvoty závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Uživatel je povinen konzultovat návod k použití konkrétní navazující aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo ověřit celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

Protokol předběžné úpravy pro tkáň

1. Přeneste vzorek tkáně do 2ml mikrocentrifugační zkumavky (nedodává se).
2. Přidejte 220 µl pufru Buffer ATL.
3. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte poklepáním na zkumavku.

Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy minisady QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Vložte zkumavku do termomixéru nebo inkubátoru–třepačky a inkubujte při 56 °C s protřepáváním při 900 ot/min, dokud nedojde k úplné lýze.

Poznámka: Doba lýzy se mění v závislosti na typu zpracovávané tkáně. U většiny tkání je lýza dokončena do 3 hodin. Pokud nebude lýza dokončena po 3 hodinách, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu nebo vysoce viskózních lyzátů, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál odstranit odstředováním, jak to popisuje krok 6. Lýza prováděná přes noc je možná a neovlivňuje nepříznivě přípravek.

5. Pro minimalizaci obsahu RNA ve vzorku přidejte 4 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě (15–25 °C), než budete pokračovat krokem 6.
6. Vzorek homogenizujte několikanásobným pipetováním nahoru a dolů.

Poznámka: Pokud jsou stále přítomny kousky nerozpustného materiálu, odstředujte při 3000 x g po dobu 1 minuty.

7. Pečlivě převedte 220 µl supernatantu do zkumavek vzorku, které jsou kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.
8. Úplný seznam kompatibilních zkumavek na vzorky naleznete v seznamu laboratorního vybavení na adrese www.qiagen.com.
Doporučujeme používat 2ml zkumavky (např. Sarstedt, kat. č. 72.693 nebo 72.608)

Tkáň FFPE

Standardní postupy FFPE vždy vedou k výrazné fragmentaci nukleových kyselin. Pro omezení rozsahu fragmentace DNA zajistěte:

- Fixujte vzorky tkání v 4–10% formaldehydu co nejrychleji po chirurgickém vyjmutí.
- Používejte fixační dobu 14–24 hodin (delší fixační časy vedou k závažnější fragmentaci DNA, což má za následek špatné výsledky následných analýz).
- Před zatavením vzorky důkladně dehydrujte (zbytkový formaldehyd může inhibovat digeraci proteinázy K)

Výchozí materiál pro purifikaci DNA by měly tvořit čerstvě připravené řezy tkáně FFPE. V jednom přípravku lze zpracovat až 4 tkáňové řezy, každý o tloušťce až 10 µm, nebo 8 řezů o tloušťce až 5 µm a povrchové ploše až 250 mm². Pokud nemáte k dispozici informace o povaze výchozího materiálu, doporučujeme začít s maximálně 3 řezy v jednom přípravku. V závislosti na výtěžku DNA a jeho čistotě lze možná použít až 8 řezů v následných přípravcích.

Poznámka: Při práci s FFPE tkáněmi je třeba vzít v úvahu normu ISO 20166-3:2018 (E) pro automatizovanou extrakci NA ze vzorků FFPE tkání, která obsahuje další informace o manipulaci se vzorky.

Poznámka: Protokoly tkáně FFPE jsou speciálně navrženy pouze pro kopurifikaci nízkých množství RNA. Povede to ke snížené hodnotě fotometrických měření v porovnání s hodnotami získanými ruční tkáňovou sadou QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit.

Předběžná úprava pro tkáň FFPE

Metoda 1: deparafinizace pomocí deparafinizačního roztoku Deparaffinization Solution

1. Skalpelem odstraňte přebytečný parafín z bloku vzorku.
2. Nařezejte až 4 řezy o tloušťce 10 µm nebo až 8 řezů o tloušťce 5 µm.
Poznámka: Pokud byl povrch vzorku vystaven působení vzduchu, první 2–3 řezy zlikvidujte.
3. Ihned vložte řezy do 2ml zkumavky Sarstedt (nedodává se s přístrojem, kat. č. 72.693 nebo 72.608), která je kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.
4. K řezům přidejte 200 µl pufru Buffer ATL.
5. Přidejte 20 µl proteinázy K.

Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy minisady QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

6. Přidejte 160 µl nebo 320 µl deparafinizačního roztoku Deparaffinization Solution (viz následující tabulka) a promíchejte ve vortexu.

| Tloušťka řezů | Počet řezů | Objem deparafinizačního roztoku Deparaffinization Solution |
|---------------|------------|---|
| 5 µm | 1–4 | 160 µl |
| | 5–8 | 320 µl |
| 10 µm | 1–2 | 160 µl |
| | 3–4 | 320 µl |

7. Vložte zkumavku do termomixéru nebo inkubátoru–třepačky a inkubujte při 56 °C na 1 hodinu s protřepáváním při 1000 ot/min (dokud nedojde k úplné lýze tkáně).

Poznámka: Doba lýzy se mění v závislosti na typu zpracovávané tkáně. U většiny tkání je lýza dokončena do 1 hodiny. Pokud nebude lýza dokončena po 1 hodinách, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál peletovat odstředováním, jak to popisuje krok 10. Lýza prováděná přes noc je možná a neovlivňuje nepříznivě přípravek.

8. Inkubujte při 90 °C po dobu 1 hodiny.

Poznámka: Inkubace při 90°C v pufru Buffer ATL částečně revertuje formaldehydovou modifikaci nukleových kyselin. Delší inkubační doby nebo vyšší inkubační teploty mohou vést k fragmentovanější DNA. Pokud použijete pouze jeden topný blok, nechte vzorek při pokojové teplotě po inkubaci při 56°C, dokud topný blok nedosáhne 90°C.

9. Pro minimalizaci obsahu RNA ve vzorku přidejte do spodní fáze 2 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 min při pokojové teplotě, než budete pokračovat krokem 10. Nechte vzorek ochladnout na pokojovou teplotu před přidáním RNázy A.
10. Odstředujte při plných otáčkách po dobu 1 minuty při pokojové teplotě.
11. Pečlivě přeneste zkumavky (obsahující obě fáze) do nosiče vzorku QIASymphony SP.

Metoda 2: deparafinizace xylenem

1. Skalpelem odstraňte přebytečný parafín z bloku vzorku.
2. Nařezejte až 4 řezy o tloušťce 10 µm nebo až 8 řezů o tloušťce 5 µm.
Poznámka: Pokud byl povrch vzorku vystaven působení vzduchu, první 2–3 řezy zlikvidujte.
3. Ihned vložte řezy do 1,5ml nebo 2ml mikrocentrifugační zkumavky (nedodává se) a přidejte k vzorku 1 ml xylenu. Uzavřete víčko a míchejte intenzivně ve vortexu 10 sekund.
4. Odstředujte při plných otáčkách po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
5. Supernatant odstraňte pipetováním. Neodebírejte žádnou hrudku.
6. K hrudce přidejte 1 ml etanolu (96–100%) a míchejte ve vortexu.
Poznámka: Etanol ze vzorku extrahuje zbytkový xylen.
7. Odstředujte při plných otáčkách po dobu 2 minut při pokojové teplotě.
8. Supernatant odstraňte pipetováním. Neodebírejte žádnou hrudku.
Poznámka: Opatrně odeberte jakýkoliv zbytkový etanol špičkou jemné pipety.
9. Otevřete zkumavku a inkubujte při pokojové teplotě (15–25°C) 10 min nebo dokud se veškerý zbytkový etanol neodpaří.
Poznámka: Inkubaci lze provést při teplotách až do 37°C.
10. Hrudku znovu suspendujte ve 220 µl pufru Buffer ATL.
11. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte ve vortexu.
Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy minisady QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
12. Inkubujte 1 hodinu při 56 °C (nebo dokud nedojde k úplné lýze vzorku).

Poznámka: Doba lýzy se mění v závislosti na typu zpracovávané tkáně. U většiny tkání je lýza dokončena do 1 hodiny. Pokud nebude lýza dokončena po 1 hodinách, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál odstranit odstředováním, jak to popisuje krok 16. Lýza prováděná přes noc je možná a neovlivňuje nepříznivě přípravek.

13. Inkubujte při 90 °C po dobu 1 hodiny.

Poznámka: Inkubace při 90°C v pufru Buffer ATL částečně revertuje formaldehydovou modifikaci nukleových kyselin. Delší inkubační doby nebo vyšší inkubační teploty mohou vést k fragmentovanější DNA. Pokud použijete pouze jeden topný blok, nechte vzorek při pokojové teplotě po inkubaci při 56°C, dokud topný blok nedosáhne 90°C.

14. Krátce odstředujte vzorek pro odstranění kapek z vnitřní strany víka.

15. Pro minimalizaci obsahu RNA ve vzorku přidejte 2 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě, než budete pokračovat krokem 16. Nechte vzorek ochladnout na pokojovou teplotu před přidáním RNázy A.

16. Pečlivě převedte 220 µl lyzátu do zkumavek vzorku, které jsou kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.

Poznámka: Pokud lyzáat obsahuje nedigerovaný materiál, odstředujte při plné rychlosti 2 minuty při pokojové teplotě před přenosem supernatantu do zkumavek vzorku. Úplný seznam kompatibilních zkumavek na vzorky naleznete v seznamu laboratorního vybavení na adrese www.qiagen.com. Doporučujeme používat 2ml zkumavky (např. Sarstedt, kat. č. 72.693 nebo 72.608).

Uchovávání eluátů

Doporučuje se vyjmout destičku s eluáty ze zásuvky „Eluate“ (Eluát) ihned po skončení cyklu. Eluční destičky mohou být ponechány v přístroji QIASymphony SP po skončení běhu přes noc (maximálně 12 hodin, včetně doby běhu; doporučené podmínky prostředí: relativní vlhkost 18–26 °C a relativní vlhkost 20-75%). V závislosti na teplotě a vlhkosti může docházet ke kondenzaci nebo vypařování eluátů.

Pro krátkodobé skladování lze eluáty uchovávat při pokojové teplotě po dobu až 2 týdnů. Pro dlouhodobé skladování doporučujeme skladovat při teplotách 2–8 °C, –20 °C nebo –80 °C.

Poznámka: Stabilita eluátů závisí na různých faktorech a souvisí s konkrétní následnou aplikací. Byla stanovena pro sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit ve spojení s příkladnými následnými aplikacemi. Uživatel je povinen konzultovat návod k použití konkrétní navazující aplikace používané v jeho laboratoři a/nebo ověřit celý pracovní postup za účelem stanovení vhodných podmínek skladování.

Důležitý bod před zahájením

- Magnetické částice QIASymphony společně purifikují RNA a DNA, pokud jsou ve vzorku přítomny obě. Pokud se požaduje DNA zbavená RNA, přidejte RNázu A do vzorku ve kroku uvedeném v příslušném protokolu předběžné úpravy.





Omezení a interferující látky

Během vývoje soupravy QIASymphony DSP DNA Mini Kit nebyly zjištěny žádné interferující látky, které by měly negativní vliv na přípravu vzorků.

Poznámka: Testování bylo provedeno pomocí příkladných následných aplikací pro posouzení kvality extrahovaných nukleových kyselin. Různé navazující aplikace však mohou mít různé požadavky na čistotu (tj. nepřítomnost potenciálních interferujících látek), takže identifikace a testování příslušných látek musí být rovněž stanoveny jako součást vývoje navazující aplikace pro jakýkoli pracovní postup zahrnující sady QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Symboly

V tomto dokumentu se vyskytují následující symboly. Úplný seznam symbolů použitých v návodu k použití nebo na obalu a označení naleznete v příručce.

| Symbol | Definice symbolu |
|---|---|
|  | Tento výrobek splňuje požadavky evropského nařízení 2017/746 o diagnostických zdravotnických prostředcích in vitro. |
|  | Zdravotnický prostředek k diagnostice in vitro |
|  | Katalogové číslo |
| Rn | R znamená revizi návodu k použití a n je číslo revize |
|  | Výrobce |

Historie revizí

Revize

Popis

R1, červen 2022

Verze 2, revize 1

- Aktualizace na verzi 2 kvůli souladu s nařízením IVD
- Doplnění oddílu Omezení a interferující látky
- Přidání oddílu Uchovávání eluátů
- Přidání oddílu Symboly
- Aktualizace oddílu Příprava materiálu vzorků

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN® nebo v uživatelské příručce. Příručky k soupravám QIAGEN a uživatelské příručky jsou k dispozici na webových stránkách www.qiagen.com nebo si je lze vyžádat od technické podpory společnosti QIAGEN či místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); BD™ (Becton Dickinson and Company); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, i když nejsou výslovně takto označeny, nelze považovat za nechráněné zákonem.
06/2022 HB-3029-S07-001© 2022 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.