

December 2017

QIASymphony[®] SP-protokolark

Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP

Dette dokument er Tissue_LC_200_V7_DSP og Tissue_HC_200_V7_DSP QIASymphony SP-protokolark, R3, til QIASymphony DSP DNA Mini-kit, version 1.

Generelle oplysninger

QIAasymphony DSP DNA-kit er beregnet til in vitro-diagnostisk brug.

Disse protokoller er til oprensning af totalt DNA fra væv og formalinfikseret, paraffinindlejret (FFPE) væv med anvendelse af QIAasymphony® SP og QIAasymphony DSP DNA Mini-kit.

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

Protokol for lavt indhold

Kit	QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr. 937236)
Prøvemateriale	FFPE-væv og væv*
Protokolnavn	Op til 4 FFPE-vævssektioner, hver med en tykkelse på op til 10 µm eller 8 sektioner med en tykkelse på op til 5 µm og et overfladeareal på op til, 250 mm ² , kan kombineres i én prøveklargøring.
Standard analysekontrolsæt	Tissue_LC_200_V7_DSP
Elueringsmængde	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Påkrævet softwareversion	Version 4.0 eller højere

* Se protokollen for højt indhold for information om vævsprøver.

Protokol for højt indhold

Kit	QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr. 937236)
Prøvemateriale	Væv
Protokolnavn	Hvis ingen information om det forventede resultat er tilgængelig, anbefaler vi at starte med 25 mg prøvemateriale. Afhængig af det opnåede resultat kan prøvestørrelsen øges i efterfølgende prøveklargøringer.
Standard analysekontrolsæt	Tissue_HC_200_V7_DSP
Elueringsmængde	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Påkrævet softwareversion	Version 4.0 eller højere

Nødvendige materialer, der ikke er vedlagt

Til alle prøvetyper

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (katalognr. 939016)
- For at minimere RNA-indhold: DNase-fri RNase A (stamopløsning på 100 mg/ml)

Til FFPE-væv (xylenfri afparaffinering)

- Afparaffineringsopløsning (Deparaffinization Solution, katalognr. 939018)

Til FFPE-væv (afparaffinering vha. xylene)

- Xylene (99–100 %)
- Ethanol (96–100 %)*

Skuffen "Sample" (Prøve)

Prøvetype	FFPE-væv og væv
Prøveinputmængde	220 µl (påkrævet pr. prøve, pr. protokol)*
Behandlet prøvemængde	200 µl
Primære prøveglasser	i/r
Sekundære prøveglasser	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for at få flere oplysninger.
Indsatser	Afhænger af den anvendte prøveglastype, for at få flere oplysninger se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] For både protokoller med højt og lavt indhold kan systemet ikke registrere, at prøvemængden er under 220 µl, fordi prøveoverførslen sker uden væskenniveaudetektion. Derfor skal det tilsikres, at prøveinputmængden er 220 µl.

i/r = ikke relevant.

Skuffen "Reagents and Consumables" (Reagenser og forbrugsartikler)

Position A1 og/eller A2	Reagenspatron
Position B1	i/r
Spidsrackholder 1–17	Engangsfilterspidser, 200 µl eller 1500 µl
Enhedsbokholder 1–4	Enhedsbokse med prøveklargøringsbeholdere eller 8-stavs dæksler

i/r = ikke relevant.

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

Skuffen "Waste" (Affald)

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

Skuffen "Eluate" (Eluat)

Elueringsrack (vi anbefaler at anvende åbning 1, affælingsposition)	Se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks for at få flere oplysninger.
---	--

Påkrævede plastikprodukter

plastikprodukter	Et batch, 24 prøver*	To batches, 48 prøver*	Tre batches, 72 prøver*	Fire batches, 96 prøver*
Engangs filterspidser, 200 µl†	26	50	74	98
Engangs filterspidser, 1500 µl†	72	136	200	264
Prøveklargøringsbeholdere§	21	42	63	84
8-stavs dæksler¶	3	6	9	12

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

† Der er 32 filterspidser/spidsrack.

‡ Antal nødvendige filterspidser indeholder filterspidser til 1 indholdsscanning per reagensbeholder.

§ Der er 28 prøveklargøringsbeholdere/enhedsboks.

¶ Der er tolv 8-stavs dæksler/enhedsboks.

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

Elueringsmængde

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

Klargøring af prøvemateriale

Der skal altid anvendes en egnet laboratoriekittel, engangshandsker og beskyttelsesbriller, når der arbejdes med kemikalier. Der findes mere information i de tilhørende sikkerhedsdatablade (material safety data sheets, SDS'er), som kan fås hos den pågældende leverandør.

Vigtigt punkt før start

- QIA Symphony magnetiske partikler oprenser både RNA og DNA, hvis begge er til stede i prøven. For at minimere indholdet af RNA i prøven tilsættes RNase A til prøven i de trin, som er angivet i den respektive forbehandlingsprotokol.

Ting, der skal gøres før start

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

Væv

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

* Sørg for, at instrumenterne regelmæssigt kontrolleres, vedligeholdes og kalibreres efter producentens anvisninger.

Forbehandlingsprotokol til væv

1. Overfør vævsprøven til et 2 ml mikrocentrifugeglas (ikke leveret).
2. Tilsæt 220 µl Buffer ATL.
3. Tilsæt 20 µl proteinase K og bland ved at banke let på glasset.

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

4. Anbring glasset i en ThermoMixer eller rysteinkubator og inkubér ved 56 °C med rystning ved 900 o/min, indtil vævet er helt lysere.

Bemærk: Lyseringstiden varierer afhængig af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 3 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 3 timer som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale eller meget viskøse lysater, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 6. Lysering i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

5. For at minimere RNA-indholdet i prøven tilsættes 4 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur (15–25 °C), før der fortsættes med trin 6.
6. Homogeniser prøven ved at pipettere op og ned flere gange.

Bemærk: Hvis stykker af uopløseligt materiale stadig er til stede, centrifugeres ved 3000 x g i 1 minut.

7. Overfør forsigtigt 220 µl supernatant til prøveglas, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.

For at få en oversigt over kompatible prøveglas, se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler at anvende 2 ml glas (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.693 eller 72.608).

FFPE-væv

Standard formalinfikserings- og paraffinindlejningsprocedurer resulterer altid i signifikant fragmentering af nukleinsyrer. For at begrænse omfanget af DNA-fragmentering skal der sørges for følgende:

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

Startmaterialet til DNA-oprensning skal være friske, afskårne sektioner af FFPE-væv. Op til 4 sektioner, hver med en tykkelse på op til 10 µm eller 8 sektioner med en tykkelse på op til 5 µm og et overfladeareal på op til 250 mm², kan behandles i én prøveklargøring. Hvis du ikke har

information om dit startmateriales beskaffenhed, anbefaler vi, at du starter med højst 3 sektioner til en enkelt prøveklargøring. Afhængig af DNA-udbyttet og dets renhed, kan det være muligt at anvende op til 8 sektioner i efterfølgende klargøringer.

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

Forbehandlingsprotokol til FFPE-væv

Metode 1: afparaffinering vha. afparaffineringsopløsning

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

Sektionernes tykkelse	Antal sektioner	Mængde afparaffineringsopløsning
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Anbring glasset i en termomixer eller rysteinkubator og inkubér ved 56 °C i 1 time med rystning ved 1000 o/min (eller indtil vævet er helt lyseret).
Bemærk: Lyseringstiden varierer afhængig af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 1 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 1 time som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale, kan lyseringstiden forlænges eller uopløseligt materiale pelleteres ved centrifugering som beskrevet i trin 10. Lysering i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

- Inkubér ved 90 °C i 1 time.

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

- For at minimere RNA-indholdet i prøven tilsættes 2 µl RNase A (100 mg/ml) til den lavere fase og inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur, før der fortsættes med trin 10. Lad prøven afkøle til stuetemperatur, før der tilsættes RNase A.
- Centrifugér ved fuld hastighed i 1 minut ved stuetemperatur.
- Overfør forsigtigt glassene (med begge faser) til prøveholderen på QIA Symphony SP.

Metode 2: afparaffinering vha. xylene

- Vha. en skalpel trimmes overskydende paraffin af prøveblokken.
- Skær op til 4 sektioner 10 µm tykt eller op til 8 sektioner 5 µm tykt.
Bemærk: Hvis prøveoverfladen er blevet udsat for luft, bortskaffes de første 2–3 sektioner.
- Anbring straks sektionerne i et 1,5 eller 2 ml mikrocentrifugeglas (ikke leveret) og der tilsættes 1 ml xylene til prøven. Luk låget og vortex kraftigt i 10 sekunder.
- Centrifugér ved fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur.
- Fjern supernatanten ved pipettering. Pelletering må ikke fjernes.
- Tilsæt 1 ml ethanol (96–100 %) til pellet'en og bland med vortexer.
Bemærk: Ethanolet ekstraherer restxylene fra prøven.
- Centrifugér ved fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur.
- Fjern supernatanten ved pipettering. Pelletering må ikke fjernes.
Bemærk: Fjern forsigtigt eventuelt restethanol vha. en fin pipettespids.
- Åbn glasset og inkubér ved stuetemperatur (15–25 °C) i 10 minutter eller indtil al det resterende ethanol er fordampet.
Bemærk: Inkubation kan udføres ved temperaturer på op til 37 °C.
- Resuspendér pellet'en i 220 µl Buffer ATL.
- Tilsæt 20 µl proteinase K og bland med vortexer.
Bemærk: Anvend proteinase K fra enzymracket i QIA Symphony DSP DNA Mini-kittet.
- Inkubér ved 56 °C i 1 time (eller indtil prøven er blevet fuldstændig lyseret).
Bemærk: Lyseringstiden varierer afhængig af den behandlede vævstype. For de fleste væv fuldføres lyseringen inden for 1 timer. Hvis lyseringen er ufuldstændig efter 1 time som angivet af tilstedeværelsen af uopløseligt materiale, kan lyseringstiden forlænges eller

uopløseligt materiale fjernes ved centrifugering som beskrevet i trin 16. Lysering i løbet af natten er mulig og påvirker ikke klargøringen.

13. Inkubér ved 90 °C i 1 time.

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

14. Centrifuger prøven kortvarigt for at fjerne dråber fra lågets inderside.

15. For at minimere RNA-indholdet i prøven tilsættes 2 µl RNase A (100 mg/ml) og inkuberes i 2 minutter ved stuetemperatur, før der fortsættes med trin 16. Lad prøven afkøle til stuetemperatur, før der tilsættes RNase A.

16. Overfør forsigtigt 220 µl af lysatet til prøveglas, der er kompatible med QIASymphony SP's prøveholder.

Bemærk: Hvis lysater indeholder uopløst materiale, centrifugeres de for fuld hastighed i 2 minutter ved stuetemperatur før supernatanten overføres til prøveglas. For at få en oversigt over kompatible prøveglas, se www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Vi anbefaler at anvende 2 ml glas (f.eks. Sarstedt, katalognr. 72.693 eller 72.608).

Revisionshistorik

Revisionshistorik for dokumentet	
R3 12/2017	Opdatering til QIASymphony softwareversion 5.0

For opdateret licensinformation og produktspecifikke ansvarsfraskrivelser henvises til den aktuelle QIAGEN® kit-håndbog eller brugervejledning. QIAGEN-kit-håndbøger og brugervejledninger kan findes på www.qiagen.com eller kan rekvireres fra QIAGENs tekniske serviceafdeling eller den lokale leverandør.

Varemærker: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Registrerede navne, varemærker osv., som er anvendt i dette dokument, selv når de ikke specifikt er markeret som sådan, skal ikke betragtes som værende juridisk ubeskyttede.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, alle rettigheder forbeholdes.

Bestilling www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Websted www.qiagen.com