

Leistungsmerkmale

RNeasy® DSP FFPE Kit, Version 1

REF 73604

Versionsmanagement

Bei dem vorliegenden Dokument handelt es sich um die Leistungsmerkmale des RNeasy DSP FFPE Kits, Version 1, R1.

  	Prüfen Sie vor einer Testausführung die Verfügbarkeit neuer elektronischer Etikettierungsrevisionen im Internet unter www.qiagen.com/HB-2416 . Der aktuelle Revisionsstand wird durch das Veröffentlichungsdatum angegeben (Format: Monat/Jahr).
---	--

Allgemeine Einleitung

Das RNeasy DSP FFPE Kit dient der Aufreinigung der Gesamt-RNA aus in formalinfixierten, paraffineingebetteten (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) Gewebeschnitten.

Das Produkt darf nur von sachkundigen Personen, z. B. technischen Angestellten oder Ärzten verwendet werden, die in der Anwendung molekularbiologischer Methoden geschult sind. Es wird ein optimiertes Protokoll mit Spin-Säulen auf Kieselgelbasis eingesetzt, das auch die enzymatische Entfernung der restlichen DNA umfasst.

Das RNeasy DSP FFPE Kit isoliert RNA-Moleküle mit mindestens 70 Nukleotiden und stellt RNA-Fragmente wieder her, die sich für nachfolgende Anwendungen wie RT-PCR eignen.

Ausbeute an gereinigter RNA

Die grundlegenden Leistungsmerkmale des RNeasy DSP FFPE Kits wurden anhand von FFPE-Proben von 5 verschiedenen humanen Geweben (Brust- bzw. Kolonkarzinom, Melanom und normale Haut; je 20 Proben) bewertet.

FFPE-Proben weisen mitunter beträchtliche Gewebheterogenität auf. Darüber hinaus schwankt die Größe der Gewebeoberfläche bei FFPE-Proben erheblich, was zu Variabilität hinsichtlich der Menge an extrahierter RNA führt. Der Benutzer sollte daher die Anzahl der Schnitte, die

Schnittdicke und die Schnittfläche hinsichtlich der jeweils relevanten Probe und der im jeweiligen Labor durchgeführten Verfahren optimieren.

Wird das Kit in Verbindung mit einer nachfolgenden QIAGEN® Anwendung verwendet, sind die Anweisungen in dem entsprechenden Handbuch zu beachten.

Eine unzureichende Entwässerung des Gewebes während der Vorbereitung des FFPE-Gewebes, die Zugabe von zu viel Paraffin zur Probe im Extraktionsröhrchen, die Verwendung von Ethanol, das nicht den empfohlenen Reinheitsgrad aufweist (d. h. die Verwendung von Ethanol mit nicht für die Molekularbiologie geeigneter Qualität), oder das Vorhandensein von Xylen- oder Ethanolrückständen in der Probe kann die Extraktion, die RNA-Mengen und die Leistungen in nachfolgenden Anwendungen beeinträchtigen.

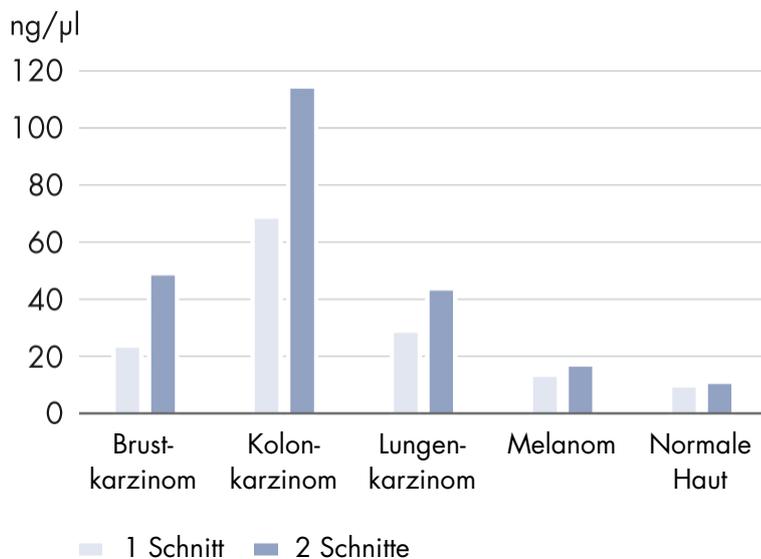


Abbildung 1: RNA-Ausbeuten aus verschiedenen humanen Geweben (Elutionsvolumen: 32 µl).

Im Anschluss durchgeführte Analysen

Die eluierte RNA ist für nachfolgende Assays gebrauchsfertig. Zur Bewertung der Leistungsmerkmale des Kits wurden 10 ng RNA mit dem RNeasy DSP FFPE Kit aus 5 verschiedenen humanen Geweben (Brust-, Kolon-, Lungenkarzinom, Melanom und normale Haut; 20 Proben mit jeweils einem oder zwei Schnitten) isoliert und mit RT-PCR (Ziel: humanes β -Aktin-Gen) validiert. Die Amplifizierung war erfolgreich. Dies beweist, dass sich die mit dem RNeasy DSP FFPE Kit isolierte RNA für nachfolgenden Anwendungen eignet.

Der Benutzer sollte die Anzahl der Schnitte, die Schnittdicke und die Schnittfläche der zu untersuchenden Proben und die im eigenen Labor anschließend durchgeführten Verfahren optimieren bzw. sich nach den spezifischen Leistungsmerkmalen des entsprechenden nachfolgenden Assays richten.

	Brust- karzinom	Kolon- karzinom	Lungen- karzinom	Melanom	Normale Haut
RT-PCR 1 Schnitt	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 Schnitte	✓	✓	✓	✓	✓

Abbildung 2: Erfolgreiche Amplifizierung mit RT-PCR von 10-µm-FFPE-Schnitten aus fünf verschiedenen getesteten humanen Geweben.

Eluatstabilität

Die Eluatstabilität hängt davon ab, wie viel Verunreinigungen (im Zusammenhang mit dem Gewebetyp) bei der Aufreinigung mitgeführt werden und welcher Art diese Verunreinigungen sind, sowie vom Elutionsvolumen und von den Aufbewahrungsbedingungen. Wir empfehlen, dass die Anwender die Eluatstabilität mit Blick auf die jeweils benötigten Bedingungen selbst ermitteln.

Es wurde die Eluatstabilität von Human-RNA-Proben aus FFPE-Schnitten, die bei -15 bis -30 °C und -60 bis -90 °C gelagert wurden, getestet. Bei einer Lagerung von bis zu 12 Wochen wurde bei diesen Proben kein Abbau beobachtet. Eluate, die bei Raumtemperatur (18-25 °C) aufbewahrt wurden, waren 12 Stunden lang stabil. Alle Bedingungen wurden mit RT-PCR (Ziel: humanes β -Aktin-Gen) untersucht.

Wird das Kit als Vorstufe für eine nachfolgende QIAGEN Anwendung verwendet, sind die Anweisungen im relevanten Handbuch zu beachten.

Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit wurde mit FFPE-Proben von kernhaltigen humanen Blutzellen bewertet. Die Proben wurden mit einem intern validierten Assay auf das 295-bp-Fragment des humanen β -Aktin-Gens auf einem ABI® 7900 Realtime-PCR-Cycler untersucht.

In die statistische Analyse gingen 108 Datenpunkte aus drei Extraktionsserien ein (gleiche Kit-Charge, gleicher Anwender und Tag) ein. Zur statistischen Analyse gehörte die Berechnung der

Standardabweichung (SD) und des Variationskoeffizienten (VK) der C_T-Werte aus der β-Aktin-RT-PCR. Die SD lag bei 1,1 C_T und der Variationskoeffizient betrug 4,1 % (Tabelle 1).

Tabelle 1. Wiederholbarkeitsergebnisse

Wiederholbarkeit			
	Mittelwert C _T	SD	VK (%)
Charge 1	26,64	1,01	3,81
Charge 2	27,51	1,16	4,2
Charge 3	27,23	0,95	3,5
Charge 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit wurde anhand von RNA-Extraktionen aus FFPE-Proben von kernhaltigen humanen Blutzellen bewertet, die von verschiedenen Anwendern an verschiedenen Tagen, verschiedenen Anwendern und an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden. Die Proben wurden mit einem intern validierten Assay auf das 295-bp-Fragment des humanen β-Aktin-Gens auf einem ABI 7900 Realtime-PCR-Cycler untersucht. In die statistische Analyse jeder Testeinstellung gingen 108 Datenpunkte aus drei Extraktionsserien ein. Zur statistischen Analyse gehörte die Berechnung der Standardabweichung (SD) und des Variationskoeffizienten (VK) der C_T-Werte aus der β-Aktin-RT-PCR (Tabelle 2).

Tabelle 2. Reproduzierbarkeitsergebnisse

Reproduzierbarkeit			
	Mittelwert C _T	SD	VK (%)
Unterschiedliche Anwender	26,92	1,06	3,95
Unterschiedliche Tage	26,56	1,20	4,53
Unterschiedliche Anwender und Tage	26,63	1,01	3,78

Linearität

Das RNeasy DSP FFPE Kit kann für die Isolierung von RNA aus verschiedenen FFPE-Gewebetypen verwendet werden. Das System wurde für 1–4 FFPE-Schnitte von kernhaltigen humanen Blutzellen validiert und zeigte eine lineare Erhöhung der RNA-Ausbeute. Der Kunde sollte seinen eigenen Anforderungen entsprechend einen linearen Bereich ermitteln und für den jeweiligen Gebrauch validieren. Für verschiedene Gewebetypen werden je nach Beladung des Systems mit Gewebe und je nach den Gewebeeigenschaften und nachfolgenden Assays unterschiedliche lineare Bereiche erwartet.

Störsubstanzen

Potenzielle Störsubstanzen können unterschiedlicher Herkunft sein, z. B. kann es sich dabei um natürliche Abbauprodukte handeln, die für den jeweiligen Gewebetyp und das jeweilige Organ spezifisch sind, um Abbauprodukte, die unter pathologischen Bedingungen gebildet werden, um Substanzen, die während der Behandlung des Patienten zugeführt wurden, oder um Substanzen, die vom Patienten selbst aufgenommen wurden. Aufgrund der Komplexität potenzieller Störsubstanzen und der unterschiedlichen Sensitivität der nachfolgenden Anwendungen empfehlen wir, dass die Anwender die Auswirkung von Störsubstanzen in ihren eigenen Systemen bewerten und eine Methode zur Kontrolle dieser Störsubstanzen bei den nachfolgenden diagnostischen Anwendungen selbst validieren.

Es wurden keine Störsubstanzen von Komponenten des RNeasy DSP FFPE Kits bei der Probenverarbeitung und RNA-Extraktion beobachtet.

Weiterführende Hinweise zu Störsubstanzen bei spezifischen nachfolgenden QIAGEN Anwendungen finden Sie in den Kit-Handbüchern.

Kreuzkontamination

Zur Bewertung des Ausmaßes an Kreuzkontamination wurde Entparaffinisierungslösung mit 500 ng Gesamt-RNA aus Blut versetzt und die RNA neben Röhrchen ohne RNA (extraktionsnegative Röhrchen) isoliert. Damit sollte in dieser Studie die Situation nachgeahmt werden, in der Proben mit hohen Ziel-RNA-Konzentrationen während der Extraktion unter Umständen andere Proben kontaminieren. Die RNA-Aufreinigung wurde mit einer Reagenzien-Charge durchgeführt. Die Kreuzkontamination wurde mit RT-PCR (Ziel: humanes β -Aktin-Gen) bewertet. Die Ergebnisse zeigten im gesamten System keinerlei Kreuzkontamination.

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Anwendungseinschränkungen finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Geräte-Handbuch. Diese stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom Technischen Service von QIAGEN oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor angefordert werden.

Markennamen: QIAGEN®, Sample to Insight®, RNeasy® (QIAGEN Group); ABI® (Life Technologies Corporation). Bei registrierten Namen, Markenzeichen usw., die in diesem Dokument genannt werden, ist nicht davon auszugehen, dass sie gesetzlich nicht geschützt sind, auch wenn sie nicht ausdrücklich als registrierter Namen bzw. registrierte Markenzeichen gekennzeichnet sind. 08/2017 HB-2416-D01 © 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/contact | Technische Beratung support.qiagen.com | Internetseite www.qiagen.com