

Helmikuu 2017

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit -käsikirja



Versio 1

IVD

In vitro -diagnostiikkaan

CE

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
SAKSA

R3 **MAT**

1062689FI



Sisältö

Käyttötarkoitus.....	5
Tiivistelmä ja kuvaus	5
Analyysimenetelmän toimintaperiaate	6
Toimitetut materiaalit	8
Pakkauksen sisältö	8
Tarvitavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen).....	9
Varoitukset ja huomautukset	10
Reagenssien säilytys ja käsittely.....	11
Näytteen käsittely ja säilytys	12
Toimenpide.....	13
Puskureiden valmistelu.....	14
Aloituserä.....	15
Ristikontaminaatiota välttävä käsittelyohje	16
Sentrifugointi.....	17
QIAamp MinElute column -putkien käsittely mikrosentrifugissa.....	17
Puhdistetun DNA:n uuttaminen	18
Protokolla: Genomisen DNA:n eristäminen FFPE-kudosaloista.....	19
Laadunvalvonta	23
Rajoitukset	23
Suoritusarvot	24
Symbolit	24
Yhteystiedot	25
Tilastiedot	26

Käyttötarkoitus

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkaus on järjestelmä, jossa käytetään piioksidikalvotekniikkaa (QIAamp-teknikkaa) genomisen DNA:n eristämiseen ja puhdistamiseen formaliini-fiksoiduista parafiiniin valetuista (FFPE) biologisista näytteistä.

Tuote on tarkoitettu sellaisten ammattilaisten, kuten tekniikkojen ja lääkärin, käyttöön, jotka ovat saaneet koulutusta in vitro -diagnostisiin (IVD) tarkoituksiin käytettävissä molekyylibiologian tekniikoissa. Tuote on tarkoitettu manuaaliseen näytteiden valmisteluun, eikä se tuota laadullisia tai laskennallisia tutkimustuloksia.

Tiivistelmä ja kuvaus

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkausta käytetään DNA:n puhdistamiseen FFPE-kudossarjoista. Siinä hyödynnetään hyvin vakiintunutta QIAamp DNA Micro -tekniikkaa genomisen ja mitokondriaalisen DNA:n puhdistamiseen tilavuudeltaan tai kooltaan pienistä näytteistä. Pakkauksessa yhdistyvät valitut piioksidikalvon sitovat ominaisuudet ja joustavat uuttamistilavuudet.

Liukenemisolosuhteet sallivat genomisen DNA:n tehokkaan puhdistuksen FFPE-kudossarjoista ilman tarvetta yön yli kestävään inkubointiin. Inkubointi korkeissa lämpötiloissa proteiinaasi K:n sulamisen jälkeen poistaa osittain vapautuneen DNA:n formaliinin ristikiinnittymistä, mikä voi mahdollisesti parantaa tuotosta sekä DNA:n suoritusta myöhemmissä määrittelyissä. Huomaa, että FFPE-näytteistä eristetyn DNA:n molekyylinen paino on yleensä pienempi kuin tuoreista tai pakastetuista näytteistä saatujen. Fragmentaation määrä on riippuvainen näytteen tyypistä ja iästä sekä kiinnitykseen käytetyistä olosuhteista.

Kun näyte on liuotettu, yksinkertainen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -toimenpide soveltuu useiden näytteiden yhtäaikaan käsittelyyn.

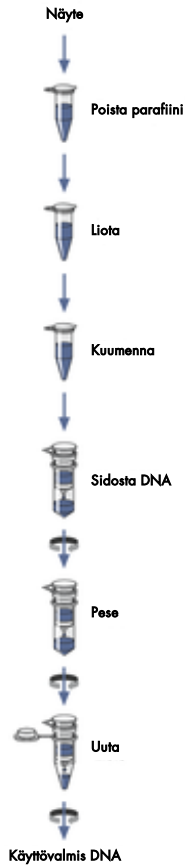
Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita käsikirjassa kuvatut QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Analyysimenetelmän toimintaperiaate

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -toimenpide koostuu kuudesta vaiheesta (Kuva 1):

- Parafiinin poisto: parafiini hajoaa ksyleeniksi ja se poistetaan.
- Liuotus: näyte liuotetaan 56 °C:ssa denaturoivissa olosuhteissa proteinaasi K:n avulla.
- Lämmitys: inkubointi 90 °C:ssa estää ja palauttaa formaliinin ristikiinnittymistä.
- Sidostus: DNA sitoutuu kalvoon ja kontaminoivat aineet virtaavat kalvon läpi.
- Pesu: kontaminoivien aineiden jäänteet pestään pois.
- Uuttaminen: puhdas, tiivistynyt DNA uutetaan kalvosta.

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



Kuva 1. QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -toimenpide.

Toimitetut materiaalit

Pakkauksen sisältö

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Luettelonumero			60404
Reaktioiden määrä			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute column -putket ja pesuputket	COL	50
WT	Wash Tubes (pesuputket) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (uuttamisputket) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (liuotusputket) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (kudoksen liuotuspuskuri)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer (liuotuspuskuri)*	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (pesupuskuri 1)* (tiiviste)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Pesupuskuri 2)† (tiiviste)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer (uuttamisuskuri)†	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (proteinaasi K)	PROTK	1,25 ml
-	Instructions For Use (Handbook) (käyttöohjeet [käsikirja])	H B	1

* Sisältää guanidiinisulua. Ei sovellu käytettäväksi yhdessä valkaisuaineita sisältävien desinfiointiaineiden kanssa. Katso sivulta 10 varoitukset ja varotoimenpiteet.

† Sisältää natriumatsidia säilöntäaineena.

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Työkenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista, jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Reagenssit

- Ksyleeni
- Etanoli (96–100 %)*

Tarvikkeet

- Jos päätetään käyttää muita kuin pakkaukseen sisältyviä putkia, suosittelemme 1,5 ml:n tai 2 ml:n mikrosentrifugiputkia (liotusvaiheisiin) ja 1,5 ml:n mikrosentrifugiputkia (uuttamisvaiheisiin) (saatavissa yritykseltä Eppendorf® [Safe-Lock: tuotenumero 022363204, Yhdysvallat; tuotenumero 0030 120.086, Eurooppa], tai Sarstedt [tuotenumero 72.690]). Suosittelemme DNAasi-/RNAasi-vapaita, kartion muotoisia putkia, joissa on turvakorkit.
- Pipetit ja pipetin kärjet (ristikontaminaation välttämiseksi suosittelemme vakavasti käyttämään pipetin kärkiä, joissa on aerosoliesteet).

Laitteisto

- Lämpösekoitin[†], kuumennettava ravistava inkubaattori, kuumennuslohko tai vesihaude, joka mahdollistaa inkuboinnin 56, 70 ja 90 °C:ssa.
- Mikrosentrifugi[†], jossa on roottori 2 ml:n putkille.
- Vortex-laite

* Älä käytä denaturoitua alkoholia, joka sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

[†] Jotta näytteiden oikea käsittely QIAamp DSP DNA FFPE -toimenpiteiden aikana voitaisiin varmistaa, suosittelemme vahvasti, että instrumentit kalibroidaan niiden valmistajan antamien ohjeiden mukaan.

Varoitukset ja huomautukset

In vitro -diagnostiikkaan

Työskenneltäessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoa saa tuotekohtaisista käyttöturvatieotteista. Ne ovat saatavilla kätevässä ja kompaktissa PDF-muodossa osoitteessa www.qiagen.com/safety, jossa voidaan tarkastella ja tulostaa kaikkien QIAGEN®-sarjan ja sarjakomponentin käyttöturvallisuustiedotteita.



HUOMIO: ÄLÄ lisää valkaisuainetta tai happamia liuoksia suoraan näytteen preparointijätteeseen.

AL- ja AW1-puskurit sisältävät guanidiinihydrokloridia, joka valkaisuaineen kanssa yhdistettynä voi muodostaa herkästi reagoivia aineita.

Jos näitä puskureita sisältäviä nesteitä pääsee roiskumaan, puhdista roiskeet sopivalla laboratoriopuhdistusaineella ja vedellä. Jos roiskuneessa nesteessä on mahdollisia tartunnanaiheuttajia, puhdista roiskeiden alue ensin laboratoriopuhdistusaineella ja vedellä ja sen jälkeen 1 %:sella (til.) natriumhypokloriitilla.

Seuraavat varoitus- ja varoimenpidelausunnot pätevät QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkauksen osiin.

AL-puskuri



Sisältää: guanidiinihydrokloridi, maleiinihappo. Varoitus! Voi olla haitallista nieltynä tai hengitettynä. Aiheuttaa ihoärsytystä. Aiheuttaa vakavaa silmien ärsytystä. Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Jos silmien ärsytys jatkuu: hakeudu lääkärin hoitoon. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: huuhtelee huolellisesti vedellä useiden minuuttien ajan. Poista piilolinssit, jos sen voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. Riisu saastunut vaatetus ja pese se ennen uudelleenkäyttöä. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE: Pese runsaalla vedellä ja saippualla. Jos ilmenee ihoärsytystä: hakeudu lääkärin hoitoon. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmäsuojainta/kasvosuojainta.

ATL-puskuri



Varoitus! Aiheuttaa vähäistä ihoärsytystä. Jos ilmenee ihoärsytystä: hakeudu lääkärin hoitoon.

AW1-puskuri



Sisältää: guanidiinihydrokloridi. Varoitus! Haitallista nieltynä tai hengitettynä. Aiheuttaa ihoärsytystä. Aiheuttaa vakavaa silmien ärsytystä. Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin, jos ilmenee pahoinvointia. Hävitä sisältö/pakkaus toimittamalla se hyväksytyyn jätelaitokseen. Riisu saastunut vaatetus ja pese se ennen uudelleenkäyttöä. Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kasvosuojainta.

Proteiinaasi K



Sisältö: proteiinaasi K. Vaara! Aiheuttaa vähäistä ihoärsytystä. Voi aiheuttaa hengitettynä allergia- tai astmaoireita tai hengitysvaikeuksia. Vältä pölyn/savun/kaasun/sumun/höyryn/suihkeen hengittämistä. Hävitä sisältö/pakkaus toimittamalla se hyväksytyyn jätelaitokseen. Jos ilmenee hengitysoireita: Ota yhteys MYRKYTYSTIETOKESKUKSEEN tai lääkäriin. JOS KEMIKAALIA ON HENGITETTY: Jos hengitysvaikeuksia, siirrä henkilö raittiiseen ilmaan ja pidä lepoasennossa, jossa on helppo hengittää. Käytä hengityksensuojainta.

Reagenssien säilytys ja käsittely

QIAamp MinElute column -putkia on säilytettävä 2–8 °C:ssa vastaanottamisen jälkeen ja niitä voidaan käyttää pakkausrasiaan merkittyn vanhenemispäivään asti.

Kaikkia puskureita voidaan säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C), ja ne ovat vakaita pakkauksen vanhenemispäivään asti. Valmiiksi valmistettuja AW1- ja AW2-puskureita voidaan kuitenkin säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C) korkeintaan yhden vuoden ajan tai pakkauksen vanhenemispäivään asti, kumpi tapahtuukin ensin.

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkaus sisältää käyttövalmiin proteinaasi K -liuoksen, joka toimitetaan erityisesti valmistetussa varastopuskuriliuoksessa. Proteinaasi K on vakaa pakkauksen vanhenemispäivään asti, kun se säilytetään huoneenlämmössä (15–25 °C).

Näytteen käsittely ja säilytys

DNA:n fragmentoitumista on pyrittävä rajoittamaan käyttämällä normaaleja formaliini-fiksoituja ja parafiinivalettuja toimenpiteitä. Muista seuraavat:

- Tee näytteille formaliinifiksaatio laboratorion toimintaohjeiden mukaan (10-prosenttinen, neutraali puskuroitu formaliini hyväksytään yleensä) mahdollisimman pian kirurgisen poiston jälkeen.
- Käytä 14–24 tunnin fiksaatioaikaa. Rajoita fiksaatioaikaa, sillä pitkittynyt fiksaatio (esim. >24 tuntia) voi johtaa vaikeaan DNA:n fragmentoitumiseen, jonka seurauksena on näytteen huono suorituskyky myöhemmissä määrittelyissä).
- Kuivata näytteet huolellisesti ennen upottamista parafiiniin (formaliinin jäännökset voivat estää proteinaasi K:n hajoamista).

DNA uutetaan ATE-puskuriin ja se on heti käyttövalmis laajennusreaktioihin tai varastoimista varten (säilytysolosuhteet ovat käyttäjän vaatimusten mukaiset). Katso myöhempien erityisten QIAGEN-sovellusten käsikirjoista suositellut säilytysolosuhteet.

Toimenpide

Tärkeitä huomioita ennen kuin aloitat

- Kaikki QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkaukseen mukana toimitetut reagenssit on tarkoitettu käytettäväksi ainoastaan muiden samaan QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkaukseen sisältyvien reagenssien kanssa. Pakkauksen reagensseja ei saa korvata muilla reagensseilla, jos halutaan säilyttää pakkauksen optimaalinen suorituskyky.
- Kun vastaanotat pakkauksen, tarkista, että siinä ei ole vaurioita. Jos rasiat tai puskuripullot ovat vahingoittuneet, ota yhteyttä QIAGENin tekniseen tukeen tai paikalliseen jälleenmyyjään. Jos nesteitä on läikkynyt, noudata kohdan Varoitukset ja huomautukset, sivu 10, ohjeita. Älä käytä vahingoittuneita pakkauksen sisältöjä, koska ne voivat haitata pakkauksen suorituskykyä.
- Älä korvaa tällä hetkellä käytettävän pakkauksen osia muiden pakkausten osilla, ellei pakkausiin ole merkitty samaa eränumeroa.
- Vältä pakkauksen reagenssien mikrobialista kontaminaatiota.
- Tätä pakkausta saavat käyttää vain henkilöt, jotka ovat saaneet koulutusta diagnostisiin in vitro -laboratoriotoimenpiteisiin.
- Estä ihon pinnan tai pölyisten laboratoriovälineiden aiheuttamat kontaminaatiot käyttämällä aina lateksi- tai vinyylikäsiineitä, kun käsittelet reagensseja ja näytteitä. Käsissä ja pölyssä voi olla bakteereita ja homeita, ne ovat yleisiä kontaminaation lähteitä. Vaihda käsineet usein ja pidä putket suljettuina.
- Käyttämättömät puskurit, suodokset ja näytteiden jäämät on hävitettävä paikallisten säädösten mukaan.
- Jos käytät omia muoviestioita, suosittelemme käyttämään koko puhdistustoimenpiteen ajan DNAasi-/RNAasi-vapaita, vähän sitovia, kertakäyttöisiä 1,5–2 ml:n kartion muotoisia polypropyleeniputkia, joissa on vakaat korkit.
- Tee kaikki sentrifugointivaiheet huoneenlämmössä (15–25 °C).

- Kaikkia puskureita on säilytettävä huoneenlämmössä (15–25 °C) ja ne on sekoitettava huolellisesti ennen käyttöä.
- Aseta lämpösekoitin tai kuumennettava ravistava inkubaattori 56 °C:seen, jotta laitetta voidaan käyttää vaiheessa 11. Jos käytettävissä ei ole lämpösekoitinta tai kuumennettavaa ravistettavaa inkubaattoria, niiden sijaan voidaan käyttää kuumennuslohkoa tai vesihaudetta.
- Jos AL-puskuri tai ATL-puskuri sisältää saostumia, liuota ne kuumentamalla liuos 70 °C:een varovasti ravistellen.
- Varmista, että AW1-puskuri ja AW2-puskuri on valmisteltu alla olevan ohjeen mukaisesti.
- QIAGEN-yhtiön laaduntarkkailumenettelyihin kuuluu julkaistun pakkauksen toiminnallinen testaus jokaisesta yksittäisestä pakkauksen valmistuserästä. Älä siis sekoita eri erien pakkauksiin kuuluvia reagensseja keskenään tai käytä muista eristä peräisin olevia yksittäisiä reagensseja pakkauksen kanssa.

Puskureiden valmistelu

ATL-puskurin valmistelu

- Tarkista ennen toimenpiteen aloittamista, onko ATL-puskuriin muodostunut saostumia. Liuota saostumat tarvittaessa lämmittämällä puskuriliuos 70 °C:een varovasti ravistellen.

AL-puskurin valmistelu

- Tarkista ennen toimenpiteen aloittamista, onko AL-puskuriin muodostunut saostumia. Liuota saostumat tarvittaessa lämmittämällä puskuriliuos 70 °C:een varovasti ravistellen.

AW1-puskurin valmistelu

- Lisää 25 ml etanolia (96–100 %) pulloon, joka sisältää 19 ml tiivistettyä AW1-puskuriliuosta. Merkitse pullon etiketissä olevaan merkintärutuun merkintä siitä, että etanoli on lisätty. Valmiiksi valmistettua AW1-puskuria voidaan säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C) korkeintaan yhden vuoden ajan tai pakkauksen vanhenemispäivään asti, kumpi tapahtuukin ensin. Suosittelemme kirjoittamaan valmiiksi valmistamisen päivämäärän puskuriliuoksen etikettiin.

Huomautus: Ennen kuin aloitat toimenpiteen, sekoita valmiiksi valmistettua AW1-puskuria ravistamalla.

AW2-puskurin valmistelu

- Lisää 30 ml etanolia (96–100 %) pulloon, joka sisältää 13 ml tiivistettyä AW2-puskuriliuosta. Merkitse pullon etiketissä olevaan merkintärutuun merkintä siitä, että etanoli on lisätty. Valmiiksi valmistettua AW2-puskuria voidaan säilyttää huoneenlämmössä (15–25 °C) korkeintaan yhden vuoden ajan tai pakkauksen vanhenemispäivään asti, kumpi tapahtuukin ensin. Suosittelemme kirjoittamaan valmiiksi valmistamisen päivämäärän puskuriliuoksen etikettiin.

Huomautus: Ennen kuin aloitat toimenpiteen, sekoita valmiiksi valmistettua AW2-puskuria ravistamalla.

Aloituspäätteen materiaali

DNA:n puhdistuksen aloitusmateriaaleja ovat FFPE-kudoksesta leikatut palat (ihanteellisesti vasta leikatut). Useita paloja voidaan yhdistää samaan preparaattiin. Jos sinulla ei ole tietoja aloitusmateriaalistasista, suosittelemme aloittamaan ottamalla korkeintaan kolme palaa preparaattia kohti.

Käyttäjän on itse määritettävä sopivin palojen määrä, paksuus ja palojen pinnan pinta-ala kaikkiin laboratorioissa käytettäviin menetelmiin. Jos pakkauksia käytetään myöhemmin yhdessä QIAGEN-sovellusten kanssa, katso ohjeita soveltuvan sovelluksen käyttöohjeesta.

Ristikontaminaatiota välttävä käsittelyohje

Nukleiinihappoa hyödyntävien vahvistustekniikoiden herkkyyden takia seuraavia varotoimia tarvitaan käsiteltäessä QIAamp MinElute column -putkia, jotta näytteiden ristikontaminaatiolta vältyttäisiin.

- Älä täytä putkia liian täyteen kudoksella.
- Vaihda leikkausveistä aina näytteiden välissä kudoksen raaputuksen aikana.
- Lisää näyte tai liuos varovasti QIAamp MinElute column -putkeen. Pipetoi näyte QIAamp MinElute column -putkeen kastelematta putken suun reunaa.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Suosittelemme käyttämään pipetin kärkiä, joissa on aerosolieste.
- Käytä näytteen pesuvaiheiden aikana aina uusia pesuputkia.
- Varmista, että putkien korkit ovat täysin kiinni ennen niiden asettamista vortex-laitteeseen tai sentrifugiin.
- Varmista, että QIAamp MinElute column -putki on suljettu täysin ennen asettamista sentrifugiin.
- Pulssi-vortex-vaiheiden ja 90 °C:ssa inkuboinnin jälkeen käytä mikrosentrifugiputkia nopeasti sentrifugissa poistaaksesi pisarat korkkien sisäpinnoilta.
- Avaa vain yksi QIAamp MinElute column -putki kerrallaan ja varo huolellisesti tuottamasta aerosoleja.
- Vaihda leikkausveistä aina näytteiden välillä.
- Vaihda pipetin kärki aina liuoksen siirtojen välillä. Jotta ristikontaminaation mahdollisuutta voidaan pienentää, suosittelemme käyttämään pipettien kärkiä, joissa on aerosolieste, ja välttämään monivaihepipettien käyttöä.
- Käytä aina kertakäyttökäsineitä ja tarkista säännöllisesti, että ne eivät ole kontaminoituneet näytemateriaalista. Hävitä käsineet, jos epäilet niiden kontaminoituneen.
- Avaa vain yksi putki kerrallaan.

Sentrifugointi

QIAamp MinElute column -putket sopivat vakiomallisiin 1,5–2 ml:n mikrosentrifugiputkiin. Lisäksi 2 ml:n pesuputkia on saatavilla erikseen (QIAGEN, luettelonro 19201). QIAamp MinElute column -putket sentrifugoidaan noin 6 000 x g:n nopeudella, jotta sentrifugin aiheuttama häiriö olisi mahdollisimman pieni. Sentrifugin käyttäminen täydellä vauhdilla ei suurena saadun DNA:n määrää. Kuitenkin QIAamp MinElute column -putkia on sentrifugoitava täydellä nopeudella kahdessa toimenpiteen vaiheessa: kuivan sentrifugin vaiheissa, kun kalvot on pesty, sekä uuttamisvaiheessa. Sentrifugointia täydellä nopeudella vaaditaan myös, jotta näyte saadaan laskemaan ksyeenikäsitteilyn jälkeen, sekä etanolipesuvaiheessa.

Kaikki sentrifugointivaiheet on suoritettava huoneenlämmössä (15–25 °C). Matala sentrifugointilämpötila voi johtaa haluttua huonompaan uuttumiseen.

QIAamp MinElute column -putkien käsittely mikrosentrifugissa

- Sulje QIAamp MinElute column -putket aina ennen niiden asettamista mikrosentrifugiin.
- Älä kosketa QIAamp MiniElute column -putken kalvoa pipetin kärjellä.
- Suodokset voivat sisältää vaarallista jätettä, ja ne on hävitettävä asianmukaisesti.
- Jotta useita näytteitä voidaan käsitellä yhtä aikaa tehokkaasti, suosittelemme telineen täyttämistä pesuputkilla, joihin QIAamp MinElute column -putket voidaan siirtää sentrifugikäsitteilyn jälkeen. Suodosta sisältävät käytetyt pesuputket voidaan hävittää, ja uudet pesuputket, joissa QIAamp MinElute column -putket ovat, voidaan asettaa suoraan sentrifugiin.
- Varmista, että kaikki näytteet ovat täysin jäljitettävissä ja tunnistettavissa koko prosessin ajan.

Puhdistetun DNA:n uuttaminen

Myöhempiä, pieniä aloitusilavuuksia vaativia sovelluksia (esim. jotkin PCR-määritykset) ajatellen tiivis uute saattaa lisätä määrittelyn herkkyyttä, mutta myös lisätä mahdollisten inhibiittoreiden pitoisuutta.

Uutetilavuuden suurentaminen vähentää DNA:n pitoisuutta uutteenä.

Saadun uutteen tilavuus voi olla noin 5 µl pienempi kuin QIAamp MinElute colum -putkeen lisätyn ATE-puskurin tilavuus. Esimerkiksi 20 µl:n uutetilavuus tuottaa ≥ 15 µl uutetta. Saadun uutteen tilavuus on riippuvainen näytteen luonteesta.

On käyttäjän vastuulla varmistaa ihanteellinen uutetilavuus käyttäjän laboratoriossa tehtäville toimenpiteille. Katso tiettyjen myöhempien QIAGEN-sovellusten suositellut uutetilavuudet kyseisten sovellusten käsikirjoista.

Saatua tilavuutta voidaan suurentaa, jos column-putkea inkuboidaan yhdessä ATE-puskuriliuoksen kanssa huoneenlämmössä esimerkiksi 5 minuuttia ennen sentrifugiin asettamista. Uutettu DNA voidaan kerätä 1,5 ml:n uuttamisputkiin (kuuluvat pakkaukseen). Uutetun DNA:n säilytysolosuhteet määräytyvät käyttäjän vaatimusten mukaan. Katso myöhempien erityisten QIAGEN-sovellusten käsikirjoista suositellut säilytysolosuhteet.

Protokolla: Genomisen DNA:n eristäminen FFPE-kudospaloista

Toimenpide

1. Leikkaa ylimääräinen parafiini näytekappaleesta leikkausveitsellä.
2. Leikkaa palat vakiomuotoisia laboratorimenetelmiä käyttäen (katso kohta Aloitusmateriaali, sivulla 15). Käyttäjän on itse määritettävä sopivin palojen määrä, paksuus ja palojen pinnan pinta-ala kaikkiin laboratorioissa käytettäviin menetelmiin. Varmista, että näytteet ovat jäljitettävissä ja tunnistettavissa koko toimenpiteen ajan.
3. Raaputa kudos paloista välittömästi steriilillä leikkausveitsellä liuotusputkessa (sisältyy pakkaukseen). Varmista, että kaikki saatavissa oleva kudos asetetaan putkeen. Lisää näytteeseen 1 ml ksyleeniä, sulje korkki ja käytä putkea vortex-laitteessa kovalla teholla, kunnes parafiini liukenee (esim. 10 s). Vältä ksyleenin roiskuminen, näytteiden välinen ristikontaminaatio ja mahdollinen kontakti ksyleenin kanssa varmistamalla, että putki on suljettu kunnolla.

Huomautus: käytä ksyleenin käytön yhteydessä vetokaappia tai muuta asianmukaista rajausvälinettä.

4. Kerää kudospelletti käyttämällä näytettä sentrifugissa täydellä teholla noin 2 minuutin ajan huoneenlämmössä. Jos kudospellettiä ei muodostu, toista vaihe.
- Huomautus:** matala sentrifugointilämpötila voi johtaa haluttua huonompaan uutumiseen.
5. Poista pinnalla kelluva osa pipetoimalla ja hävitä se. Kerää pelletti talteen. Pinnalla kelluva osa sisältää ksyleeniä, joka on vaarallista jätettä ja joka on hävitettävä soveltuvien paikallisten säännösten mukaan.
 6. Lisää 1 ml etanolia (96–100 %) kudospellettiin ja sekoita huolellisesti vortex-laitteessa. Etanoli imee ksyleenin jäänteitä näytteestä ja on siksi hävitettävä asianmukaisesti.

7. Käytä näytettä sentrifugissa täydellä teholla noin 2 minuutin ajan huoneenlämmössä.

Poista pinnalla kelluva osa pipetoimalla. Älä poista pelletin osia.

Poista huolellisesti kaikki jäänyt alkoholi pienellä pipetin kärjellä. Avaa putki ja inkuboi 15–40 °C:ssa, kunnes etanolijäämät ovat haihtuneet. Etanolijäämien poisto on erittäin tärkeä uuttamisen onnistumisen kannalta.

Huomautus: matalampi inkubointilämpötila hidastaa haihtumisaikaa, kun taas korkeampi lämpötila voi kuivattaa pellettiä liikaa ja tehdä siitä vaikeasti suspendoitavaa.

8. Suspendoi pelletti uudelleen 180 µl:ssa ATL-puskuria. Lisää 20 µl proteinaasi K:ta ja sekoita vortex-laitteessa.

Huomautus: pelletin on oltava hyvin uudelleensuspendoitunut ATL-puskuriin, jotta tuotetta saataisiin mahdollisimman paljon.

9. Inkuboi 56 °C:ssa (± 3 °C) noin 1 tunnin ajan (kunnes näyte on liuonnut täysin).

10. Inkuboi 90 °C:ssa (± 5 °C) 1 tunnin ajan (± 5 minuuttia).

Inkubointi 90 °C:ssa erityisesti ATL-puskurissa kääntää formaldehydin muutoksen nukleiinihappoissa päinvastaiseksi. Lyhempi inkubointiaika tai matalampi inkubointiaika voi vaikuttaa DNA:n määrään tai laatuun. Jos käytät vain yhtä kuumennuslohkoa, jätä näyte huoneenlämpöön 56 °C:ssa inkuboinnin jälkeen, kunnes kuumennuslohko on saavuttanut 90 °C:n lämmön.

11. Poista tipat korkin sisäpuolelta käyttämällä putkea nopeasti sentrifugissa.

12. Lisää 200 µl AL-puskuria näytteeseen ja sekoita huolellisesti vortex-laitteessa. Lisää sitten 200 µl etanolia (96–100 %) ja sekoita näytettä taas huolellisesti vortex-laitteessa.

On erittäin tärkeää, että näyte, AL-puskuri ja etanoli sekoitetaan välittömästi ja huolellisesti vortex-laitteessa tai pipetoimalla, jotta saadaan aikaan homegeeninen liuos. AL-puskuri ja etanoli voidaan sekoittaa ennakolta ja lisätä yhdessä yhden vaiheen aikana, jotta säästetään aikaa käsiteltäessä useita näytteitä. Kun AL-puskuri ja etanoli lisätään, saattaa muodostua valkoista saostumaa. Tämä saostuma ei haittaa QIAamp-toimenpidettä. Käytä aina tuotetta sekoitusta ja hävitä se heti käytön jälkeen.

13. Poista tipat korkin sisäpuolelta käyttämällä putkea nopeasti sentrifugissa.

14. Siirrä varovasti koko liuote QIAamp MinElute column -putkeen (2 ml:n pesuputkessa) kastelematta putken reunaa, sulje korkki ja käytä sentrifugissa noin 6 000 x g:ssä ≥ 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp MinElute column -putki puhtaaseen 2 ml:n pesuputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja hävitä pesuputki, joka sisältää suodosta.

Jos liuote ei ole kulkenut kokonaan kalvon läpi sentrifugikäsittelyn jälkeen, käytä näyte sentrifugissa uudelleen suuremmalla nopeudella, kunnes QIAamp MinElute column -putki on tyhjä.

15. Avaa QIAamp MiniElute column -putki varovasti ja lisää 500 μ l AW1-puskuriliuosta kastelematta putken reunaa. Sulje korkki ja käytä sentrifugissa noin 6 000 x g:ssä ≥ 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp MinElute column -putki puhtaaseen 2 ml:n pesuputkeen ja hävitä suodosta sisältävä pesuputki.

16. Avaa QIAamp MiniElute column -putki varovasti ja lisää 500 μ l AW2-puskuriliuosta kastelematta putken reunaa. Sulje korkki ja käytä sentrifugissa noin 6 000 x g:ssä ≥ 1 minuutin ajan. Aseta QIAamp MinElute column -putki puhtaaseen 2 ml:n pesuputkeen ja hävitä suodosta sisältävä pesuputki.

QIAamp MinElute column -putken ja suodoksen välistä kontaktia on vältettävä. Muista tasapainottaa sentrifugin roottori. Joidenkin sentrifugien roottorit voivat väristä vauhdin hidastumisen aikana, jolloin etanolipitoinen suodos pääsee kontaktiin QIAamp MinElute column -putken kanssa. Huolehdi poistaessasi QIAamp MinElute column -putkea ja pesuputkea roottorista, että suodos ei pääse kontaktiin QIAamp MinElute column -putken kanssa.

17. Sentrifugoi täydellä nopeudella (n. 20 000 x g) noin kolmen minuutin ajan, jotta kalvo kuivuisi täysin.

Uutteeseen kulkeutunut etanoli voi haitata joissakin myöhemmissä sovelluksissa.

18. Aseta QIAamp MiniElute column -putki puhtaaseen 1,5 ml:n uuttamisputkeen (sisältyy pakkaukseen) ja häviitä suodosta sisältävä pesuputki. Avaa QIAamp MiniElute column -putken korkki varovasti ja lisää 20–200 µl AE-puskuria kalvon keskelle.

TÄRKEÄÄ: Jos käytät pieniä uutetilavuuksia (<50 µl), laita ATE-puskuri kalvon keskelle varmistaaksesi, että sitoutunut DNA uuttuu kokonaan. QIAamp MinElute column -putket mahdollistavat monipuolisen uutetilavuuden määrittämisen. Määritä tilavuus myöhempien sovellusten tarpeiden mukaan. Saadun uutteen tilavuus voi olla noin 5 µl pienempi kuin column-putkeen lisätyn uuteliuoksen tilavuus.

19. Sulje korkki ja inkuboi huoneenlämmössä (15–25 °C) vähintään 1 minuutin ajan. Käytä sentrifugissa täydessä nopeudessa (noin 20 000 x g) ≥1 minuutin ajan.

ATE-puskuria sisältävän QIAamp MinElute column -putken inkuboiminen noin 5 minuutin ajan huoneenlämmössä ennen sentrifugointia voi suurentaa DNA-tuotosta.

Laadunvalvonta

QIAGENin ISO-sertifioidun laadunvarmistusjärjestelmän mukaisesti jokainen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkauksen erä testataan määrättyjen vaatimusten mukaisesti tuotteiden yhdenmukaisen laadun takaamiseksi.

Rajoitukset

Pakkauksen suorituskyky on todettu käyttämällä formaliini-fiksoituja, parafiinivalettuja kudoksia (FFPE-kudoksia) genomisen DNA:n eristämiseen.

Käyttäjän vastuulla on validoida järjestelmän suorituskyky kaikissa niissä laboratoriossa käytetyissä menetelmissä, joita käsikirjassa kuvatut QIAGENin tekemät suorituskykytutkimukset eivät kata.

Jotta voidaan minimoida diagnostisiin tuloksiin kohdistuvan negatiivisen vaikutuksen riski, myöhemmissä sovelluksissa on hyödynnettävää riittävää laaduntarkkailua. Lisävalidointiin suositellaan käytettäväksi seuraavia ohjeita: International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) -ohjeita ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.

Saatu diagnostinen tulos on tulkittava yhdessä muiden kliinisten löydösten tai laboratoriolöydösten kanssa.











Kun QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkausta käytetään, RNA saattaa puhdistua yhdessä DNA:n kanssa, jos sitä on näytteessä.

Suoritusarvot

Katso QIAamp DSP DNA FFPE Tissue -pakkauksen suoritusarvot osoitteesta www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.

Symbolit

Pakkauksessa ja etiketeissä saattaa näkyä seuraavia symboleita:

Symboli	Symbolin määritelmä
	Sisältää reagensseja, jotka riittävät <N> reaktioon
	Viimeinen käyttöpäivämäärä
	Diagnostinen in vitro -lääkintälaitte
	Vastaanotettaessa
	Tuotenumero
	Eränumero
	Materiaalinumero
	Komponentit
	Sisältö
	Numero

Symboli

Symbolin määritelmä



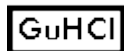
Kirjoita päivämäärä etanolin lisäämisen jälkeen



Etanoli



Lisätty



Guanidiinihydrokloridi



Maleiinihappo



GTIN-numero



Lämpötilarajoitus



Valmistaja



Katso käyttöohjeet



Huomio

Yhteystiedot

Jos tarvitset teknistä neuvontaa tai lisätietoja, käy teknisen tukemme sivuilla osoitteessa www.qiagen.com/Support, soita ilmaisnumeroomme 00800-22-44-6000 tai ota yhteyttä johonkin QIAGENin teknisen palvelun osastoon (ks. takakansi tai käy osoitteessa www.qiagen.com).

Tilaustiedot

Tuote	Sisältö	Katalogi-numero
QIAamp DNA FFPE Tissue -pakkaus – genomisen DNA:n puhdistukseen parafiiniin valetuista kudoksenäytteistä		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50:een DNA:n valmistelukertaan: 50 QIAamp MinElute® Column -putkia, proteinaasi K, puskurit, pesuputket (2 ml), uuttamisputket (1,5 ml), liuotusputket (2 ml)	60404

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN-sarjojen käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Rajoitettu lisenssisopimus QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit -käsikirjaan

Tämän tuotteen käyttö tarkoittaa ostajan tai käyttäjän suostumusta noudattaa seuraavia ehtoja:

1. Tuotetta saa käyttää ainoastaan tuotteen mukana toimitettujen protokollien ja tämän käsikirjan mukaisesti sekä ainoastaan paneelin sisältämien osien kanssa. QIAGEN ei myönnä henkisen omaisuutensa lisenssiä tarkoitukseen käyttää tai liittää tämän paneelin sisältämiä osia muiden osien kanssa, jotka eivät sisälly tähän paneeliin lukuun ottamatta osia, jotka kuvataan tuotteen mukana toimitetuissa protokollissa, tässä käsikirjassa ja muissa protokollissa, jotka ovat saatavana osoitteessa www.qiagen.com. QIAGENin käyttäjät ovat toimitaneet joitakin näistä protokollista toisille QIAGENin käyttäjille. QIAGEN ei ole testannut tai tarkistanut kyseistä materiaalia. QIAGEN ei anna takuuta lisämateriaalille eikä takaa, ettei se loukkaa kolmannen tahon oikeuksia.
2. Muutoin kuin selvästi ilmoitettujen lisenssien osalta QIAGEN ei takaa, että tämä paneeli ja/tai sen käyttäjä(t) ei (eivät) loukkaa kolmansien osapuolten oikeuksia.
3. Tämä paneeli ja sen osat on lisensoitu kertakäyttöön, ja niiden uudelleenkäyttö, kunnostaminen tai edelleenmyynti ovat kiellettyjä.
4. QIAGEN sanoutuu irti muista suorista ja epäsuorista lisensseistä.
5. Paneelin ostaja tai käyttäjä suostuu siihen, ettei hän suorita tai anna muiden suorittaa toimenpiteitä, jotka voisivat johtaa edellä mainittuihin kiellettyihin tapahtumiin tai edesauttaa niiden syntymistä. QIAGEN saattaa vedota tämän rajoitetun lisenssisopimuksen kieltoihin tuomioistuimessa. QIAGEN perii kaikki tutkinta- ja oikeuskulut asianajajan palkkiot mukaan lukien, jotka aiheutuvat tämän rajoitetun lisenssisopimuksen tai sen henkistä omaisuutta koskevien oikeuksien toimeenpanemisesta paneeliin ja/tai sen osien osalta.

Päivitetty lisenssiehdot saa osoitteesta www.qiagen.com.

Hel-17 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset: www.qiagen.com/contact | Tekninen tuki: support.qiagen.com | Verkkosivusto: www.qiagen.com