

Februar 2017

Priložnik za komplet QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue



Različica 1



Za diagnostično uporabo in vitro



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
NEMČIJA



R3 1062689SL



Vsebina

Namen uporabe.....	5
Pregled in razlaga	5
Princip postopka.....	6
Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo	8
Vsebina kompleta.....	8
Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo	9
Previdnosti ukrepi in opozorila	10
Shranjevanje in ravnanje z reagenti.....	11
Ravnanje z vzorci in njihovo shranjevanje	12
Postopek.....	13
Priprava pufrov	14
Vhodni material	15
Postopek ravnanja za preprečevanje navzkrižne kontaminacije.....	16
Centrifugiranje.....	17
Obdelava kolon QIAamp MinElute v mikroepreveti.....	17
Elucija očiščene DNA.....	18
Protokol: Izolacija genomske DNA iz rezin tkiva FFPE	19
Kontrola kakovosti	23
Omejitve	23
Značilnosti	24
Simboli.....	24
Kontaktne podatki	25
Informacije za naročanje.....	26

Namen uporabe

Komplet QIAamp DSP DNA FFPE Tissue je sistem, ki uporablja tehnologijo membrane na osnovi silicijevega dioksida (tehnologijo QIAamp) za izolacijo in čiščenje genomske DNA iz bioloških vzorcev, fiksiranih s formalinom in vklopljenih v parafin (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE).

Izdelek je namenjen uporabnikom s strokovnim znanjem, kot so tehniki in zdravniki, ki so usposobljeni za uporabo tehnik molekularne biologije za diagnostične namene *in vitro* (in vitro diagnostic, IVD). Namenjen je za ročno pripravo vzorcev in ne podaja nobenih kvalitativnih ali kvantitativnih rezultatov testov.

Pregled in razlaga

Komplet QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se uporablja za čiščenje DNA iz rezin tkiva FFPE. Uporablja dobro uveljavljeno tehnologijo QIAamp DNA Micro za čiščenje genomske in mitohondrijske DNA iz majhnega števila vzorcev ali majhnih vzorcev. Komplet združuje sposobnost selektivne vezave membrane na osnovi silicijevega dioksida s prilagodljivimi elucijskimi volumni.

Pogoji lize omogočajo učinkovito čiščenje DNA iz rezin tkiva FFPE brez potrebe po celonočni inkubaciji. Inkubacija pri visoki temperaturi po razgradnji s proteinazo K delno odstrani zamreženje sproščene DNA s formalinom, kar lahko izboljša izkoristek ter tudi rezultate, dobljene z DNA v zaključnih testih. Upoštevajte, da ima DNA, izolirana iz vzorcev tkiva FFPE, običajno manjšo relativno molekulsko maso kot DNA iz svežih ali zamrznjenih vzorcev. Stopnja fragmentacije je odvisna od vrste in starosti vzorca ter pogojev fiksacije.

Po lizi vzorca se preprost postopek s kompletom QIAamp DSP DNA FFPE Tissue lahko uporabi za sočasno obdelavo več vzorcev.

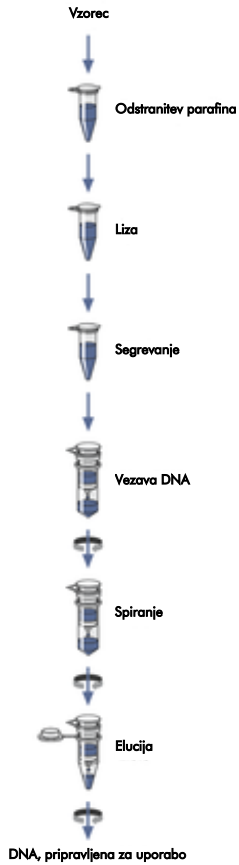
Uporabnik je sam odgovoren za to, da potrdi učinkovitost sistema za kakršne koli postopke, izvedene v laboratoriju, ki jih študije učinkovitosti družbe QIAGEN, opisane v priročniku, niso zajele.

Princip postopka

Postopek s kompletom QIAamp DSP DNA FFPE Tissue ima šest korakov (Slika 1):

- Odstranitev parafina: parafin se raztopi v ksilenu in odstrani.
- Liza: vzorec se lizira s proteinazo K pri temperaturi 56 °C in pod denaturacijskimi pogoji.
- Segrevanje: inkubacija pri 90 °C odstrani zamreženje s formalinom.
- Vezava: DNA se veže na membrano, nato skozi njo stečejo kontaminanti.
- Spiranje: sperejo se preostali kontaminanti.
- Elucija: iz membrane se eluira čista, koncentrirana DNA.

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



Slika 1. Postopek s kompletom QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Potrebna oprema, ki je vključena v dobavo

Vsebina kompleta

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Kataložna številka			60404
Število reakcij			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (kolone QIAamp MinElute z epruvetami za spiranje)	COL	50
WT	Wash Tubes (epruvete za spiranje (2 ml))	WASH TUBE	3 × 50
ET	Elution Tubes (epruvete za elucijo (1,5 ml))	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (epruvete za lizo (2 ml))	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (pufer za lizo tkiva)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (pufer za lizo)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (pufer za spiranje (koncentrat))	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (concentrate) (pufer za spiranje (koncentrat))	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer† (pufer za elucijo)	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (proteinaza K)	PROTK	1,25 ml
–	Navodila za uporabo (priročnik)	HB	1

* Vsebuje gvanidinijevo sol. Ni združljiv z razkužili, ki vsebujejo belilo. Za opozorila in previdnostne ukrepe glejte stran 10.

† Vsebuje konzervans natrijev azid.

Potrebna oprema, ki ni vključena v dobavo

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih, ki so na voljo pri dobavitelju izdelka.

Reagenti

- Ksilen
- Etanol (96- do 100-odstotni)*

Potrošni material

- Če se odločite, da ne boste uporabili epruvet iz kompleta, priporočamo, da uporabite 1,5- ali 2-mililitrske mikroeprevete (za korake lize) in 1,5-mililitrske mikroeprevete (za korake elucije) (na voljo pri proizvajalcu Eppendorf® [Safe-Lock: kat. št. 022363204, ZDA; kat. št. 0030 120.086, Evropa] ali Sarstedt [kat. št. 72.690]). Priporočamo konične epruvete brez DNaze/RNaze, ki imajo varnostne pokrovčke.
- Pipete in konice pipet (za preprečevanje navzkrižne kontaminacije močno priporočamo konice pipet, ki so odporne proti aerosolom).

Oprema

- Termomešalnik ThermoMixer[†], ogrevani orbitalni inkubator, grelni blok ali vodna kopel, primerna za inkubacijo pri 56 °C, 70 °C in 90 °C.
- Mikroepreveta[†] z rotorjem za 2-mililitrske epruvete

* Ne uporabljajte denaturiranega alkohola, ki vsebuje druge snovi, kot je metanol ali metiletilketon.

*Ne uporabljajte denaturiranega alkohola, ki vsebuje druge snovi, kot je metanol ali metiletilketon.

[†] Da bi zagotovili pravilno obdelavo vzorcev med postopki s kompletom QIAamp DSP DNA FFPE, močno priporočamo, da instrumente umerite v skladu s priporočili proizvajalcev.

- Vibracijski mešalnik

Previdnosti ukrepi in opozorila

Za diagnostično uporabo in vitro

Pri delu s kemikalijami vedno nosite ustrezno laboratorijsko haljo, rokavice za enkratno uporabo in zaščitna očala. Več informacij poiščite v ustreznih varnostnih listih. Ti so v priročni in kompaktni obliki PDF na voljo v spletu na naslovu www.qiagen.com/safety, kjer lahko najdete, preberete in natisnete varnostne liste za vse komplete QIAGEN® ter njihove sestavne dele.



POZOR: NE dodajajte belila ali kislih raztopin neposredno v odpadke, nastale pri pripravi vzorca.

Pufer AL in pufer AW1 vsebujeta gvanidinijev klorid, ki lahko v kombinaciji z belilom tvori zelo reaktivne spojine.

Če se tekočina, ki vsebuje ta pufera, razlije, jo očistite z ustreznim laboratorijskim detergentom in vodo. Če razlita tekočina vsebuje snovi, ki lahko povzročijo okužbe, polito območje očistite najprej z laboratorijskih detergentom in vodo ter nato še z 1-odstotno (v/v) raztopino natrijevega hipoklorita.

Za sestavne dele kompleta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue veljajo naslednji stavki o nevarnosti in previdnostni stavki.

Pufer AL



Vsebuje: gvanidinijev klorid, maleinsko kislino. Pozor! Lahko je zdravju škodljivo pri zaužitju ali vdihavanju. Povzroča draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Lahko povzroči alergijski odziv kože. Če draženje oči ne preneha: poiščite zdravniško pomoč/ oskrbo. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. Sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo. PRI STIKU S KOŽO: umiti z veliko mila in vode. Če nastopi draženje kože: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Pufer ATL



Pozor! Povzroča blago draženje kože. Če nastopi draženje kože: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo.

Pufer AW1



Vsebuje: gvanidinijev klorid. Pozor! Zdravju škodljivo pri zaužitju ali vdihavanju. Povzroča draženje kože. Povzroča hudo draženje oči. Ob slabem počutju pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika. Odstraniti vsebino/posodo na odobrena odlagališča. Sleči kontaminirana oblačila in jih oprati pred ponovno uporabo. Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz.

Proteinaza K



Vsebuje: proteinazo K. Nevarnost! Povzroča blago draženje kože. Lahko povzroči simptome alergije ali astme ali težave z dihanjem pri vdihavanju. Ne vdihavati prahu/dima/plina/meglice/hlapov/razpršila. Odstraniti vsebino/posodo na odobrena odlagališča. Pri respiratornih simptomih: pokličite CENTER ZA ZASTRUPITVE ali zdravnika. PRI VDIHAVANJU: Pri oteženem dihanju prenesti žrtev na svež zrak in jo pustiti počivati v položaju, ki olajša dihanje. Nositi opremo za zaščito dihal.

Shranjevanje in ravnanje z reagenti

Kolone QIAamp MinElute po prejemu shranite pri temperaturi od 2–8 °C in jih uporabite do izteka roka uporabnosti, navedenega na škatli kompleta.

Vsi pufri se lahko shranjujejo pri sobni temperaturi (15–25 °C) in so stabilni do izteka roka uporabnosti kompleta. Rekonstituirana puфра AW1 in AW2 pa lahko shranjujete pri sobni temperaturi

(15–25 °C) največ 1 leto ali do izteka roka uporabnosti kompleta, kar nastopi prej.

Komplet QIAamp DSP DNA FFPE Tissue vsebuje raztopino proteinaze K, ki je že pripravljena za uporabo in dobavljena v posebej pripravljenem puftru za shranjevanje. Proteinaza K je stabilna do izteka roka uporabnosti kompleta, če je shranjena pri sobni temperaturi (15–25 °C).

Ravnanje z vzorci in njihovo shranjevanje

Za omejitev stopnje fragmentacije DNA uporabite standardne postopke za fiksiranje s formalinom in vklapljanje v parafin, pri čemer bodite pozorni na naslednje:

- Vzorke tkiva fiksirajte s formalinom v skladu z laboratorijskim protokolom (običajno je odobrena 10-odstotna nevtralna raztopina pufera s formalinom), čim prej po kirurškem odvzemu.
- Čas fiksacije naj bo od 14–24 ur. Čas fiksacije naj ne bo predolg, saj daljša fiksacija (na primer več kot 24 ur) lahko povzroči višjo stopnjo fragmentacije DNA in posledično slabe rezultate pri zaključnih testih).
- Dobro izsušite vzorce pred vklapljanjem (ostanki formalina lahko zavirajo razgradnjo s proteinazo K).

DNA se eluira v puftru ATE in je takoj pripravljena za uporabo v reakcijah za amplifikacijo ali za shranjevanje (pogoji so odvisni od potreb uporabnika). Za priporočene pogoje shranjevanja za posamezne zaključne postopke s kompleti znamke QIAGEN glejte priročnike zadevnih kompletov.

Postopek

Pomembno pred začetkom

- Vsi reagenti iz kompleta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue se lahko uporabijo samo z drugimi reagenti iz istega kompleta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Da bi zagotovili optimalne rezultate, reagentov iz kompleta ne zamenjajte z nobenimi drugimi.
- Ob prejemu kompleta preverite, ali so kateri sestavni deli morda poškodovani. Če so ovojnina ali stekleničke s pufrom poškodovane, se obrnite na Oddelek za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnega distributerja. Ob razlitju tekočine glejte »Previdnosti ukrepi in opozorila« na strani 10). Poškodovanih sestavnih delov kompleta ne smete uporabiti, saj se sicer lahko zgodi, da z uporabo kompleta ne boste dobili zelenih rezultatov.
- Kompleta, ki ga trenutno uporabljate, ne uporabljajte skupaj s sestavnimi deli iz drugih kompletov, razen če imajo povsem enake serijske številke.
- Preprečite kontaminacijo reagentov iz kompleta z mikrobi.
- Ta komplet lahko uporablja samo osebje, usposobljeno za delo z diagnostičnimi laboratorijskimi pripomočki *in vitro*.
- Pri delu z reagenti in vzorci vedno nosite rokavice iz lateksa ali vinila, saj boste tako preprečili kontaminacijo s površine kože ali prašne laboratorijske opreme. Na rokah in prašnih delcih so lahko bakterije in plesni, zato so pogost vir kontaminacije. Rokavice pogosto menjajte, epruvete pa naj bodo zaprte.
- Neuporabljene pufre, nevezane frakcije in ostanke vzorcev zavržite v skladu z lokalnimi postopki.
- Če uporabljate lastne pripomočke iz plastičnih snovi, priporočamo, da med celotnim postopkom čiščenja uporabljate 1,5- do 2-mililitrske polipropilenske nizko vezavne konične epruvete brez DNaze/RNaze za enkratno uporabo, ki imajo varnostne pokrovčke.

- Vse korake centrifugiranja izvedite pri sobni temperaturi (15–25 °C).
- Vse pufre shranjujte pri sobni temperaturi (15–25 °C) in jih pred uporabo dobro premešajte.
- Nastavite termomešalnik ali ogrevani orbitalni inkubator na 56 °C za uporabo v koraku 11. Če nimate niti termomešalnika niti ogrevanega orbitalnega inkubatorja, lahko uporabite grelni blok ali vodno kopel.
- Če pufer AL ali pufer ATL vsebuje oborino, jo raztopite tako, da pufer ob rahlem mešanju segrejete na 70 °C.
- Pufer AW1 in pufer AW2 morata biti obvezno pripravljena po navodilih, opisanih zgoraj.
- Postopki kontrole kakovosti družbe QIAGEN zajemajo preskus funkcionalnosti kompletov pred dajanjem na trg, ki se opravi za vsako posamezno serijo kompletov. Zato ne mešajte reagentov iz različnih serij kompletov in ne kombinirajte posameznih reagentov iz različnih serij reagentov.

Priprava pufrov

Priprava pufra ATL

- Pred začetkom postopka preverite, ali je v pufri ATL nastala oborina. Po potrebi ga ob rahlem mešanju segrejte na 70 °C.

Priprava pufra AL

- Pred začetkom postopka preverite, ali je v pufri AL nastala oborina. Po potrebi ga ob rahlem mešanju segrejte na 70 °C.

Priprava pufra AW1

- V stekleničko, ki vsebuje 19 ml koncentriranega pufra AW1, dodajte 25 ml etanola (96- do 100-odstotnega). Označite okvirček na nalepki na steklenički in tako označite, da je bil etanol že dodan. Rekonstituirani pufer AW1 lahko shranjujete pri sobni temperaturi (15–25 °C) največ 1 leto ali do izteka roka uporabnosti kompleta, kar nastopi prej. Priporočamo, da na nalepko na pufru zapišete datum rekonstitucije.

Opomba: pred začetkom postopka pretresite pufer AW1 in ga tako premešajte.

Priprava pufra AW2

- V stekleničko, ki vsebuje 13 ml koncentriranega pufra AW2, dodajte 30 ml etanola (96- do 100-odstotnega). Označite okvirček na nalepki na steklenički in tako označite, da je bil etanol že dodan. Rekonstituirani pufer AW2 lahko shranjujete pri sobni temperaturi (15–25 °C) največ 1 leto ali do izteka roka uporabnosti, navedenega na kompletu, kar nastopi prej. Priporočamo, da na nalepko na pufru zapišete datum rekonstitucije.

Opomba: pred začetkom postopka pretresite pufer AW2 in ga tako premešajte.

Vhodni material

Vhodni materiali za čiščenje DNA so izrezane rezine tkiva FFPE (po možnosti ravnokar izrezane). Med enim postopkom priprave je mogoče kombinirati več rezin. Če nimate nobenih podatkov o lastnostih vhodnega materiala, priporočamo, da pripravo začnete z največ tremi rezinami.

Uporabnik mora optimizirati število rezin, njihovo debelino in površino za katere koli postopke, ki se bodo izvajali v laboratoriju. Če boste komplet uporabljali v povezavi z zaključnim postopkom s kompletom znamke QIAGEN, preberite navodila v zadevnem priročniku.

Postopek ravnanja za preprečevanje navzkrižne kontaminacije

Zaradi občutljivosti tehnologij amplifikacije nukleinske kisline so pri ravnanju s kolonami QIAamp MinElute potrebni naslednji previdnostni ukrepi za preprečevanje navzkrižne kontaminacije vzorcev:

- Ne prenapolnite epruvet z vzorci.
- Med odvzemanjem delcev tkiva za vsak vzorec uporabite drug skalpel.
- Vzorec ali raztopino previdno nanesite v kolono QIAamp MinElute. Vzorec v kolono QIAamp MinElute nanesite s pipeto in pri tem ne zmočite roba kolone.
- Med prenosi tekočin menjavajte pipete. Priporočamo uporabo konic pipet, odpornih proti aerosolom.
- Za spiranje vzorcev vedno uporabite nove epruvete za spiranje.
- Pred vibracijskih mešanjem in centrifugiranjem dobro zaprite pokrovčke epruvet.
- Pred centrifugiranjem dobro zaprite kolono QIAamp MinElute.
- Ko končate vse korake pulznega vibracijskega mešanja in inkubacije pri 90 °C, na hitro centrifugirajte mikroeprevete in tako odstranite kapljice z notranje strani pokrovčkov.
- Odpirajte samo po eno kolono QIAamp MinElute hkrati in preprečite nastanek aerosolov.
- Med odvzemanjem vzorcev vedno menjajte skalpele.
- Med prenosi tekočin menjavajte pipete. Za zagotovitev čim manjše navzkrižne kontaminacije priporočamo, da uporabite konice pipet, odporne proti aerosolom, in ne uporabljate večstopenjskih pipet.
- Vedno nosite rokavice za enkratno uporabo in redno preverjajte, ali so morda kontaminirane z vzorčnim materialom. Če se vam zdi, da bi lahko bile kontaminirane, jih zavržite.
- Odpirajte samo po eno epruveto hkrati.

Centrifugiranje

Kolone QIAamp MinElute se prilegajo večini najbolj standardnih 1,5- do 2-mililitrskih mikroeprevet. Posebej so na voljo dodatne 2-mililitrske epruvete za spiranje (QIAGEN, kat. št. 19201). Centrifugiranje kolon QIAamp MinElute se izvede pri približno 6000 x g, s čimer se zmanjša hrup centrifuge. Centrifugiranje pri polni hitrosti ne bo izboljšalo izkoristkov DNA. Vendar pa je centrifugiranje kolon QIAamp MinElute pri polni hitrosti potrebno pri dveh korakih postopka: pri koraku centrifugiranja s sušenjem po spiranju membran in koraku elucije. Centrifugiranje pri polni hitrosti je potrebno tudi po obdelavi s ksilenom in koraku spiranja z etanolom, da se vzorec usede na dno.

Vse korake centrifugiranja je treba izvesti pri sobni temperaturi (15–25 °C). Nizka temperatura centrifugiranja lahko povzroči neoptimalno ekstrakcijo.

Obdelava kolon QIAamp MinElute v mikroepreveti

- Preden kolone QIAamp MinElute daste v mikroepreveto, jih vedno najprej zaprite.
- Pazite, da se s konico pipete ne dotaknete membrane kolone QIAamp MinElute.
- Nevezane frakcije lahko vsebujejo nevarne odpadke, zato jih je treba zavreči na ustrezen način.
- Za učinkovito vzporedno obdelavo več vzorcev priporočamo, da na stojalo postavite epruvete za spiranje, v katere boste po centrifugiranju lahko prenesli kolone QIAamp MinElute. Uporabljene epruvete za spiranje, ki vsebujejo nevezane frakcije, lahko zavržete, nove epruvete za spiranje, ki vsebujejo kolone QIAamp MinElute, pa postavite neposredno v mikroepreveto.
- Pazite, da med celotnim postopkom ohranite popolno sledljivost vzorcev.

Elucija očiščene DNA

V zaključnih postopkih, ki zahtevajo majhne vhodne volumne (npr. nekateri testi s PCR), bolj koncentriran eluat lahko poveča občutljivost testa, vendar pa lahko povzroči tudi povečanje koncentracije morebitnih zaviralcev.

Povečanje elucijskega volumna bo zmanjšalo koncentracijo DNA v eluatu.

Volumen zbranega eluata je lahko za približno 5 μ l manjši od volumna pufr ATE, danega v kolono QIAamp MinElute. Na primer, iz elucijskega volumna 20 μ l boste dobili \geq 15 μ l eluata. Volumen zbranega eluata je odvisen od lastnosti vzorca.

Uporabnik je sam odgovoren za to, da optimizira elucijski volumen za katere koli postopke, ki se izvajajo v laboratoriju. Za priporočene elucijske volumne, potrebne za posamezne zaključne postopke s kompleti znamke QIAGEN, glejte priročnike kompletov.

Izkoristke lahko povečate, če kolono inkubirate s pufrom ATE pri sobni temperaturi, na primer 5 minut pred centrifugiranjem. Eluirano DNA lahko zberete v 1,5-mililitrske epruvete za elucijo (priložene). Pogoji shranjevanja eluirane DNA so odvisni od potreb uporabnika. Za priporočene pogoje shranjevanja za posamezne zaključne postopke s kompleti znamke QIAGEN glejte priročnike kompletov.

Protokol: Izolacija genomske DNA iz rezin tkiva FFPE

Postopek

1. S skalpelom odstranite odvečni parafin z vzorčnega bloka.
2. Izrežite rezine v skladu s standardno laboratorijsko prakso (glejte »Vhodni material« na strani 15). Uporabnik mora optimizirati število rezin, njihovo debelino in površino za katere koli postopke, ki se bodo izvajali v laboratoriju. Med celotnim postopkom zagotovite sledljivost vzorcev.
3. S sterilnim skalpelom takoj postrgajte tkivo z rezin v epruveto za lizo (priložena). Poskrbite, da boste v epruveto dali vso razpoložljivo tkivo. V vzorec dodajte 1 ml ksilena, zaprite pokrovček in intenzivno mešajte z vibracijskim mešalnikom, dokler se parafin ne raztopi (npr. 10 s). Epruveto morate obvezno tesno zapreti, saj boste tako preprečili razlitje ksilena, navzkrižno kontaminacijo vzorcev in morebitni stik s ksilenom.

Opomba: ksilen uporabljajte v digestorijih ali drugih zaščitnih napravah.

4. Centrifugirajte pri polni hitrosti in sobni temperaturi približno 2 minuti, da boste lahko zbrali tkivno usedlino. Če tkivne usedline ni, korak ponovite.

Opomba: nizka temperatura centrifugiranja lahko povzroči neoptimalno ekstrakcijo.

5. S pipetiranjem odstranite supernatant in ga zavržite. Usedlino pustite.

Supernatant vsebuje ksilen, ki je nevaren odpadek, zato ga zavržite na primeren način v skladu z lokalnimi predpisi.

6. V tkivno usedlino dodajte 1 ml etanola (96- do 100-odstotnega) in dobro premešajte z vibracijskim mešalnikom.

Etanol ekstrahira preostali ksilen iz vzorca, zato ga je treba zavreči na primeren način.

7. Centrifugirajte pri polni hitrosti in sobni temperaturi približno 2 minuti.

S pipetiranjem odstranite supernatant. Usedline ne odstranite.

S tanko konico pipete previdno odstranite preostali etanol. Odprite epruveto in jo inkubirajte pri 15–40 °C, dokler ves preostali etanol ne izhlapi. Odstranitev preostalega etanola je ključna za uspešno ekstrakcijo.

Opomba: nižja temperatura inkubacije podaljša čas izhlapevanja, medtem ko višja temperatura lahko preveč izsuši usedlino, ki jo boste zato težko suspendirali.

8. Ponovno suspendirajte usedlino v 180 µl pufru ATL. Dodajte 20 µl proteinaze K in premešajte z vibracijskim mešalnikom.

Opomba: usedlino morate dobro ponovno suspendirati v pufru ATL, saj boste tako zagotovili največji izkoristek.

9. Inkubirajte pri 56 °C ± 3 °C približno 1 uro (dokler vzorec ni popolnoma liziran).

10. Inkubirajte pri 90 °C ± 5 °C 1 uro ± 5 minut.

Inkubacija v pufru ATL pri 90 °C delno izniči formaldehidno modifikacijo nukleinskih kislin. Krajši časi inkubacije ali nižje temperature inkubacije lahko vplivajo na kakovost in količino DNA. Če uporabljate samo en grelni blok, vzorec po inkubaciji pri 56 °C pustite na sobni temperaturi, dokler se grelni blok ne segreje na 90 °C.

11. Na hitro centrifugirajte epruveto in tako odstranite kapljice z notranje strani pokrovčka.

12. V vzorec dodajte 200 µl pufru AL in dobro premešajte z vibracijskim mešalnikom. Nato dodajte 200 µl etanola (96- do 100-odstotnega) in ponovno dobro premešajte z vibracijskim mešalnikom.

Ključnega pomena je, da vzorec, pufer AL in etanol takoj dobro zmešate z vibracijskim mešalnikom ali pipetiranjem, da boste dobili homogeno raztopino. Pufer AL in etanol lahko že predhodno zmešate in ju dodate skupaj v enem koraku, da prihranite čas, kadar obdelujete več vzorcev. Ko dodate pufer AL in etanol, se lahko tvori bela oborina. Ta oborina ne vpliva na postopek s kompletom QIAamp. Vedno uporabite svežo zmes in jo takoj po uporabi zavržite.

13. Na hitro centrifugirajte epruveto in tako odstranite kapljice z notranje strani pokrovčka.

14. Previdno prenesite ves lizat v kolono QIAamp MinElute (v 2-mililitrski epruveti za spiranje) in pri tem pazite, da ne zmočite njenega roba, zaprite pokrovček in najmanj 1 minuto centrifugirajte pri približno 6000 x g. Postavite kolono QIAamp MinElute v čisto 2-mililitrsko epruveto za spiranje (priložena) in zavržite epruveto za spiranje, v kateri so nevezane frakcije.

Če lizat po centrifugiranju ni v celoti prešel skozi membrano, centrifugiranje ponovite pri višji hitrosti, dokler kolona QIAamp MinElute ne bo prazna.

15. Previdno odprite kolono QIAamp MinElute in dodajte 500 μ l rekonstituiranega pufra AW1 ter pri tem pazite, da ne zmočite roba. Zaprite pokrovček in najmanj 1 minuto centrifugirajte pri približno 6000 x g. Postavite kolono QIAamp MinElute v čisto 2-mililitrsko epruveto za spiranje in zavržite epruveto za spiranje, v kateri so nevezane frakcije.

16. Previdno odprite kolono QIAamp MinElute in dodajte 500 μ l rekonstituiranega pufra AW2 ter pri tem pazite, da ne zmočite roba. Zaprite pokrovček in najmanj 1 minuto centrifugirajte pri približno 6000 x g. Postavite kolono QIAamp MinElute v čisto 2-mililitrsko epruveto za spiranje in zavržite epruveto za spiranje, v kateri so nevezane frakcije.

Preprečite stik med kolono QIAamp MinElute in nevezanimi frakcijami. Rotor centrifuge morate obvezno centrirati. Nekateri rotorji centrifug lahko med pospeševanjem vibrirajo, zaradi česar nevezane frakcije, ki vsebujejo etanol, pridejo v stik s kolono QIAamp MinElute. Med odstranjevanjem kolone QIAamp MinElute in epruvete za spiranje iz rotorja pazite, da nevezane frakcije ne pridejo v stik s kolono QIAamp MinElute.

17. Centrifugirajte pri polni hitrosti (približno 20.000 x g) približno 3 minute in tako popolnoma posušite membrano.

Prenos etanola v eluat lahko negativno vpliva na nekatere zaključne postopke.

18. Postavite kolono QIAamp MinElute v čisto 1,5-mililitrsko epruveto za elucijo (priložena) in zavrzite epruveto za spiranje, v kateri so nevezane frakcije. Previdno odprite pokrovček kolone QIAamp MinElute in nanesite 20–200 μ l pufru ATE na sredino membrane.

POMEMBNO: če ste uporabili majhen elucijski volumen ($< 50 \mu$ l), pufer ATE razlijte na sredino membrane, s čimer boste zagotovili popolno elucijo vezane DNA. Kolone QIAamp MinElute omogočajo, da izberete zelo različne elucijske volumne. Volumen izberite glede na zahteve zaključnega postopka. Volumen eluata bo za približno 5 μ l manjši od volumna elucijske raztopine, dane v kolono.

19. Zaprite pokrovček in inkubirajte pri sobni temperaturi (15–25 °C) najmanj 1 minuto. Centrifugirajte pri polni hitrosti (približno 20.000 x g) najmanj 1 minuto.

Približno 5-minutna inkubacija kolone QIAamp MinElute, napolnjene s pufrom ATE, pri sobni temperaturi pred centrifugiranjem lahko poveča izkoristek DNA.

Kontrola kakovosti

V skladu s sistemom vodenja kakovosti družbe QIAGEN, certificiranim po standardu ISO, se vsaka serija kompletov QIAamp DSP DNA FFPE Tissue preskusi v skladu z vnaprej določenimi specifikacijami, s čimer se zagotovi stalna kakovost izdelka.

Omejitve

Učinkovitost kompleta je bila dokazana za izolacijo genomske DNA pri uporabi tkiv, fiksiranih s formalinom in vklopljenih v parafin (tkiv FFPE).

Uporabnik je sam odgovoren za to, da potrdi učinkovitost sistema za kakršne koli postopke, izvedene v laboratoriju, ki jih študije učinkovitosti družbe QIAGEN, opisane v priročniku, niso zajele.

Pri zaključnih postopkih je treba uporabiti zadostne kontrole in tako zmanjšati tveganje za negativen vpliv na diagnostične rezultate. Za nadaljnjo validacijo priporočamo smernice International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) in ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology.

Vsi generirani diagnostični rezultati morajo biti interpretirani v povezavi z drugimi kliničnimi ali laboratorijskimi ugotovitvami.











S kompletom QIAamp DSP DNA FFPE Tissue lahko skupaj z DNA očistite tudi RNA, če je ta prisotna v vzorcu.

Značilnosti

Podatki o značilnostih kompleta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue so na voljo na spletni strani www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.











Simboli

Na embalaži in oznakah so lahko prikazani naslednji simboli:

Simbol	Opredelitev simbola
 Σ <N>	Vsebuje dovolj reagentov za <N> reakcij
	Uporabno do
	Diagnostični medicinski pripomoček <i>in vitro</i>
	Ob dobavi
	Kataloška številka
	Serijska številka
	Številka materiala
	Komponente
	Vsebuje
	Številka

Simbol

Opredelitev simbola

	Zapišite tekoči datum, ko v stekleničko dodate etanol
	Etanol
	Dodajanje
	Gvanidinijev klorid
	Maleinska kislina
	Globalna trgovinska identifikacijska številka
	Omejitev temperature
	Proizvajalec
	Glejte navodila za uporabo
	Pozor

Kontaktne podatke

Za tehnično pomoč in več informacij obiščite naš Center za tehnično podporo na www.qiagen.com/Support, pokličite na 00800-22-44-6000 ali stopite v stik z Oddelkom za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnim distributerjem (glejte zadnjo platnico ali obiščite spletno mesto www.qiagen.com).

Informacije za naročanje

Izdelek	Vsebina	Kat. št.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – za čiščenje genomske DNA iz tkiv, vklapljenih v parafin		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Za 50 pripravkov DNA: 50 kolon QIAamp MinElute®, proteinaza K, pufri, epruvete za spiranje (2 ml), epruvete za elucijo (1,5 ml), epruvete za lizo (2 ml)	60404

Posodobljene informacije o licenciranju in zavrnitve odgovornosti za izdelek so na voljo v priročniku ali navodilih za uporabo zadevnega kompleta znamke QIAGEN. Priročniki in navodila za uporabo kompletov znamke QIAGEN so na voljo na spletni strani www.qiagen.com, lahko pa jih tudi naročite pri Oddelku za tehnične storitve družbe QIAGEN ali lokalnem distributerju.

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

Sporazum o licenčnih omejitvah za priročnik za komplet QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

Kupec ali uporabnik izdelka z njegovo uporabo soglaša z naslednjimi pogoji:

1. Izdelek se lahko uporablja zgolj v skladu s protokoli, ki so priloženi izdelku, in s to knjižico ter skupaj s sestavnimi deli iz panela. QIAGEN v okviru svoje intelektualne lastnine ne ponuja licenc za uporabo ali kombiniranje priloženih sestavnih delov tega panela s sestavnimi deli, ki niso priloženi temu panelu, razen kot je opisano v protokolih, ki so priloženi izdelku, tem priročniku in dodatnih protokolih, ki so na voljo na www.qiagen.com. Nekatere od teh dodatnih protokolov so ustvarili uporabniki QIAGEN za uporabnike QIAGEN. Družba QIAGEN teh protokolov ni temeljito testirala ali optimizirala. QIAGEN ne ponuja garancije ali jamstva, da ti ne kršijo pravic drugih strank.
2. Razen izrecno navedenih licenc družba QIAGEN ne daje drugih jamstev, da ta panel in/ali njegova uporaba ne krši pravic tretjih strank.
3. Ta panel in njegovi sestavni deli so licencirani za enkratno uporabo in jih ni dovoljeno ponovno uporabiti, obnoviti ali prodajati naprej.
4. QIAGEN zlasti zavrača kakršne koli druge licence, izrecne ali nakazane, razen tistih, ki so izrecno navedene.
5. Kupec in uporabnik tega panela se strinjata, da ne bosta ukrepala ali dovolila drugim, da ukrepajo v smeri, ki bi vodila v ali omogočala katerega od zgoraj prepovedanih dejanj. QIAGEN lahko prepovedi iz tega Sporazuma o licenčnih omejitvah uveljavlja na katerem koli sodišču ter dobi povrnjene vse svoje stroške za preiskavo in sodišče, vključno s stroški za odvetnika, pri katerem koli dejanju za uveljavitev tega Sporazuma o licenčnih omejitvah ali pravice intelektualne lastnine v povezavi s tem panelom in/ali njegovimi sestavnimi deli.

Za posodobljene licenčne pogoje glejte www.qiagen.com.

Februar 2017 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, vse pravice pridržane.

Naročila www.qiagen.com/contact | Tehnična podpora support.qiagen.com | Spletna stran www.qiagen.com