




Prestatiekenmerken

RNeasy® DSP FFPE Kit, versie 1

REF 73604

Versiebeheer

Dit document beschrijft de prestatiekenmerken van de RNeasy DSP FFPE Kit, versie 1, R1.

  	Controleer voordat u een test gaat uitvoeren of er nieuwe (herziene) elektronische bijsluiters beschikbaar zijn op www.qiagen.com/HB-2416 . De status van de huidige herziening is aangegeven door middel van de uitgifedatum (in de vorm maand/jaar).
---	--

Algemene inleiding

De RNeasy DSP FFPE Kit is bedoeld voor zuivering van het totale RNA uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefsels (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Het product is bedoeld voor toepassing door beroepsmatige gebruikers, bijvoorbeeld analisten en artsen die zijn opgeleid in moleculair-biologische technieken. Het maakt gebruik van een geoptimaliseerd silica-spinkolom-protocol en omvat enzymatische verwijdering van residueel DNA.

De RNeasy DSP FFPE Kit isoleert RNA-moleculen langer dan 70 nucleotiden en biedt herstel van bruikbare RNA-fragmenten voor downstream-processen, zoals RT-PCR.

Opbrengst van gezuiverd RNA

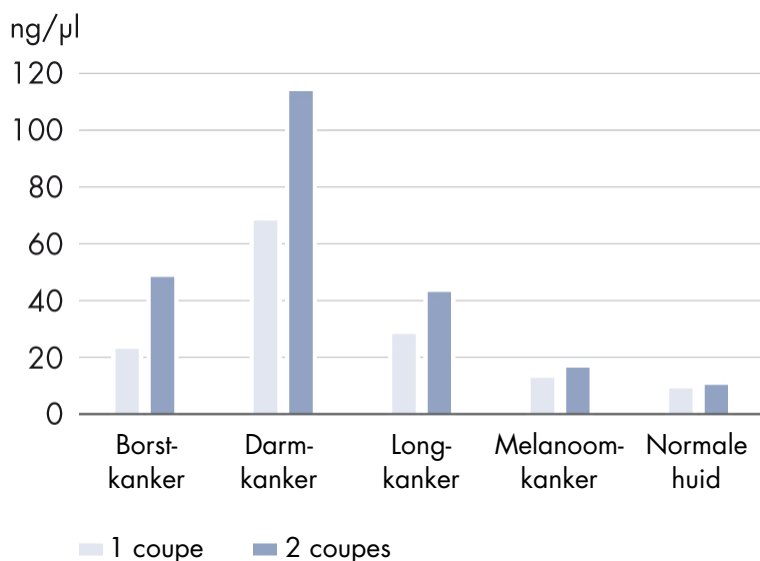
De basisprestaties van de RNeasy DSP FFPE Kit zijn geëvalueerd met gebruik van FFPE-monsters van 5 verschillende menselijke weefsels (borst, darm, long, melanoomkanker en normale huid; van elk 20 monsters).

FFPE-monsters kunnen een hoge mate van weefselheterogeniteit vertonen. Bovendien kan het oppervlaktegebied van weefsel per FFPE-monster sterk verschillen, waardoor de hoeveelheid geëxtraheerd RNA kan variëren. Het is daarom aan de gebruiker om het aantal coupes, de dikte

van coupes en het oppervlakgebied van coupes, en alle eventuele andere procedures die in het betreffende laboratorium worden gebruikt, voor hun monsters te optimaliseren.

Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN® voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de betreffende handleiding.

Onvoldoende dehydratie tijdens het prepareren van het weefsel door middel van FFPE; te veel paraffine toevoegen aan het monster in het extractiebuisje; het gebruik van ethanol met een lagere dan de aanbevolen zuiverheidsgraad (niet voor moleculaire biologie); of de aanwezigheid van achtergebleven ethanol in het monster kan leiden tot een suboptimale extractie en een lage hoeveelheid RNA of verminderde prestaties in vervolgprocessen.



Afbeelding 1. RNA-opbrengst van verschillende menselijke weefsels (elutievolume van 32 µl).

Downstream-analyse

Geëluereerd RNA is gebruiksklaar voor downstream-assays. Voor evaluatie van de prestaties werd 10 ng RNA geïsoleerd met de RNeasy DSP FFPE Kit uit 5 verschillende menselijke weefsels (borst, darm, long, melanoomkanker en normale huid; 20 monsters met één of twee coupes) en gevalideerd met gebruik van RT-PCR gericht op het menselijke β -actine-gen. De amplificatie was geslaagd, hetgeen aantoont dat RNA dat is geïsoleerd met de RNeasy DSP FFPE Kit kan worden gebruikt voor downstream-analyse.

Het is aan de gebruiker om het aantal coupes, de dikte van coupes en het oppervlaktegebied van coupes, en alle eventuele volgende procedures die in het betreffende laboratorium worden gebruikt, voor hun monsters te optimaliseren of om de specifieke prestaties van de relevante downstream-assay te raadplegen.

	Borst- kanker	Darm- kanker	Long- kanker	Melanoom- kanker	Normale huid
RT-PCR 1 coupe	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 coupes	✓	✓	✓	✓	✓

Afbeelding 2. Geslaagde RT-PCR-amplificatie van FFPE-coupes van 10 µm voor vijf verschillende menselijke weefsels getest.

Stabiliteit van het eluaat

De stabiliteit van het eluaat is afhankelijk van de samenstelling en het soort verontreinigingen die bij de zuivering zijn meegekomen (hangt samen met het weefseltype), het elutievolume en de opslagomstandigheden. Wij raden gebruikers aan de stabiliteit van het eluaat te bepalen zoals nodig volgens hun specifieke vereisten.

De stabiliteit van het eluaat is getest voor FFPE-afgeleide menselijke RNA-monsters, bewaard bij –15 tot –30 °C en –60 tot –90 °C. Er is geen achteruitgang waargenomen gedurende 12 weken en eluaten die werden bewaard bij kamertemperatuur (18–25 °C) waren gedurende 12 uur stabiel. Alle omstandigheden zijn beoordeeld met gebruik van RT-PCR gericht op het menselijke β -actine-gen.

Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de handleiding van de betreffende kit.

Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid is geëvalueerd met gebruik van een FFPE-monster van kernhoudende menselijke bloedcellen. De monsters zijn getest met een intern gevalideerde assay voor een 295 bp-fragment van het menselijke β -actine-gen in een ABI® 7900 real-time PCR-toestel.

Voor statistische analyse zijn 108 gegevenspunten uit drie extractiebatches (dezelfde kitpartij, laborant, dag) gebruikt. De statistische analyse omvatte berekening van de standaardafwijking (SA) en variatiecoëfficiënt (VC) van de C_T -waarden die zijn afgeleid uit de RT-PCR met β -actine. De SA bedroeg 1,1 C_T en de variatiecoëfficiënt was 4,1% (tabel 1).

Tabel 1. Resultaten voor herhaalbaarheid

Herhaalbaarheid			
	Gemiddelde C _T	SA	VC (%)
Batch 1	26,64	1,01	3,81
Batch 2	27,51	1,16	4,2
Batch 3	27,23	0,95	3,5
Batch 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid is bepaald aan de hand van beoordeling van RNA-extracties uit FFPE-monsters van kernhoudende menselijke bloedcellen met verschillende laboranten, op verschillende dagen en verschillende laboranten en dagen. De monsters zijn getest met een intern gevalideerde assay voor een 295 bp-fragment van het menselijke β -actine-gen in een ABI 7900 real-time PCR-toestel. Voor statistische analyse zijn 108 gegevenspunten uit drie extractiebatches gebruikt voor elke testopstelling. De statistische analyse omvatte berekening van de standaardafwijking (SA) en variatiecoëfficiënt (VC) van de C_T-waarden die zijn afgeleid uit de RT-PCR met β -actine (tabel 2).

Tabel 2. Resultaten voor reproduceerbaarheid

Reproduceerbaarheid			
	Gemiddelde C _T	SA	VC (%)
Verschillende laboranten	26,92	1,06	3,95
Verschillende dagen	26,56	1,20	4,53
Verschillende laboranten en dagen	26,63	1,01	3,78

Lineariteit

De RNeasy DSP FFPE Kit kan worden gebruikt voor het isoleren van RNA uit verschillende FFPE-weefseltypes. Het systeem is gevalideerd voor gebruik van 1–4 FFPE-coupees van kernhoudende menselijke bloedcellen en heeft een lineaire verhoging van de RNA-opbrengst aangetoond. Voor de specifieke vereisten van de klant dient een lineair bereik te worden vastgesteld en gevalideerd voor het betreffende gebruik. Voor verschillende weefseltypes is een verschillend lineair bereik te verwachten, afhankelijk van de hoeveelheid gebruikt weefsel in het systeem, de kenmerken van het betreffende weefsel en de betreffende downstream-assays.

Stoffen met een versturende werking

Uit verschillende bronnen kunnen stoffen afkomstig zijn die versturend kunnen werken. Voorbeelden hiervan zijn natuurlijke omzettingsproducten die specifiek zijn voor het weefseltype en het orgaan, omzettingsproducten die geproduceerd worden onder pathologische omstandigheden, stoffen die tijdens de behandeling van de patiënt worden geïntroduceerd, of stoffen die door de patiënt zijn ingeslikt. Vanwege de complexiteit van stoffen die versturend kunnen werken en verschillen in de gevoeligheid van specifieke downstream-processen, raden wij gebruikers aan het effect van versturende stoffen voor hun eigen systemen te bepalen en een methode om verstoring tegen te gaan in hun specifieke diagnostische downstream-proces te valideren.

Tijdens de monsterverwerking en RNA-extractie zijn geen versturende stoffen opgemerkt die zijn afgeleid van componenten van de RNeasy DSP FFPE Kit.

Raadpleeg de handleiding van de betreffende kit voor meer informatie over versturende stoffen in specifieke downstream-processen van QIAGEN.

Kruiscontaminatie

Om de mate van kruiscontaminatie te bepalen, is 500 ng totaal RNA uit bloed toegevoegd aan de deparaffineeroplossing en geïsoleerd grenzend aan buisjes zonder RNA (extractie-negatieve buisjes). In dit onderzoek werd geprobeerd een situatie na te bootsen waarin monsters met een hoog gehalte RNA-moleculen via kruiscontaminatie andere monsters in dezelfde extractieprocedure kunnen verontreinigen. RNA-zuivering werd met één partij reagentia uitgevoerd. De kruiscontaminatie is beoordeeld met gebruik van RT-PCR gericht op het menselijke β -actine-gen. Uit de resultaten bleek dat er binnen het gehele systeem geen kruiscontaminatie was opgetreden.

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Bestellen www.qiagen.com/contact | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com