

2017. gada februāris

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit rokasgrāmata



50

1. versija

IVD

Lietošanai in vitro diagnostikā



REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
VĀCIJA

R3 **MAT**

1062689LV



Saturs

Paredzētais lietojums	5
Kopsavilkums un skaidrojums	5
Procedūras princips	6
Nodrošinātie materiāli	8
Komplekta saturs	8
Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti	9
Brīdinājumi un piesardzības pasākumi	10
Reaģentu glabāšana un lietošana	11
Paraugu materiāla apstrāde un uzglabāšana	12
Procedūra	13
Buferšķīdumu sagatavošana	14
Sākotnējais materiāls	15
Apstrādes procedūra, lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas	15
Centrifugēšana	16
QIAamp MinElute stobriņu apstrāde mikrocentrifūgā	17
Izdalīto DNS eluēšana	17
Protokols: genoma DNS izolēšana no FFPE audu daļām	19
Kvalitātes kontrole	23
Ierobežojumi	23
Veiktspējas raksturojums	24
Simboli	24
Kontaktinformācija	25

Informācija pasūtīšanai.....	26
------------------------------	----

Paredzētais lietojums

Komplekts QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ir sistēma, kurā tiek izmantota silīcija dioksīda membrānas tehnoloģija (QIAamp tehnoloģija) genoma DNS izolēšanai un izdalīšanai no formalīnā fiksētiem un parafīnā iegultiem (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) bioloģiskajiem paraugiem.

Šis produkts ir paredzēts izmantošanai tikai profesionāliem lietotājiem, piemēram, tehniķiem un ārstiem, kuri ir apmācīti lietot molekulāri bioloģiskās metodes in vitro diagnostikas nolūkos. Tas ir paredzēts manuālai paraugu sagatavošanai, un tam nav ne kvalitatīvu, ne kvantitatīvu testa rezultātu.

Kopsavilkums un skaidrojums

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit tiek izmantots DNS izdalīšanai no FFPE audu daļām. Tam tiek izmantota vispārātzīta QIAamp DNA Micro tehnoloģija genoma un mitohondriju DNS izdalīšanai no maziem parauga tilpumiem vai lielumiem. Komplektā ir apvienotas silīcija dioksīda membrānas selektīvās saistīšanas īpašības ar pielāgojamiem eluēšanas tilpumiem.

Līzes apstākļi ļauj efektīvi izdalīt genoma DNS no FFPE audu daļām, neveicot inkubāciju visu nakti. Inkubācija paaugstinātā temperatūrā pēc proteināzes K noārdīšanās daļēji samazina atbrīvoto DNS formalīna šķērsšūšanos, potenciāli palielinot iegūto DNS daudzumu un uzlabojot DNS rezultātus pakārtotajās analizēs. Ņemiet vērā, ka no FFPE paraugiem izolētajām DNS parasti ir zemāka molekulmasa nekā DNS, kas iegūtas no svaigiem vai saldētiem paraugiem. Sadrumstalotības pakāpe ir atkarīga no parauga veida un vecuma un fiksācijai izmantotajiem apstākļiem.

Pēc paraugu līzes vienkāršā QIAamp DSP DNA FFPE Tissue procedūra ir piemērota vienlaicīgai vairāku paraugu apstrādei.

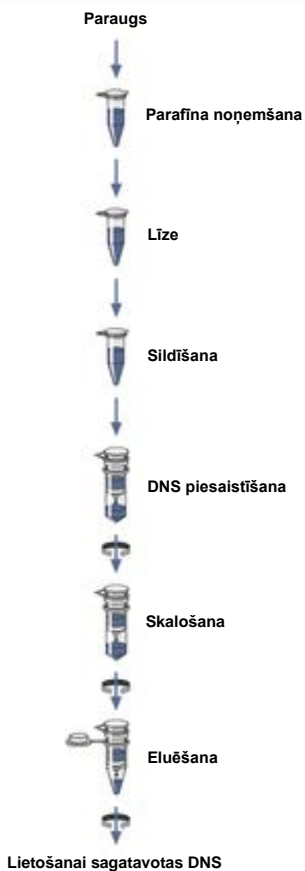
Lietotāja pienākums ir pārbaudīt sistēmas veiktspēju attiecībā uz visām viņa laboratorijā izmantotajām procedūrām, kas nav ietvertas rokasgrāmatā aprakstītajos QIAGEN veiktspējas pētījumos.

Procedūras princips

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue procedūra ietver sešus posmus (1. attēls):

- Parafīna noņemšana: parafīns tiek izšķīdināts ksilolā un noņemts
- Līze: paraugs tiek lizēts 56 °C temperatūrā denaturācijas apstākļos ar proteīnāzi K
- Sildīšana: inkubācija 90 °C temperatūrā novērš formālīna šķērsšūšanos
- Saistīšana: DNS piesaistās ar membrānu un caur to izplūst piesārņotāji
- Skalošana: tiek noskaloti atlikušie piesārņotāji
- Eluēšana: izdalītas, koncentrētas DNS tiek eluētas no membrānas

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue procedūra



1. attēls. QIAamp DSP DNA FFPE Tissue procedūra.

Nodrošinātie materiāli

Komplekta saturs

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Kataloga Nr.			60404
Reakciju skaits			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute stobriņi ar skalošanas stobriņiem)	COL	50
WT	Wash Tubes (Skalošanas stobriņi) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (Eluēšanas stobriņi (1,5 ml))	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Līzes stobriņi) (2 ml))	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Audu līzes buferšķīdums)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (Līzes buferšķīdums)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Skalošanas buferšķīdums 1) (koncentrāts)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (Skalošanas buferšķīdums 2) (koncentrāts)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer (Eluēšanas buferšķīdums)†	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (Proteināze K)	PROTK	1,25 ml
-	Lietošanas instrukcija (rokasgrāmata)	HB	1

* Satur guanidīna sāli. Nav saderīgs ar dezinfekcijas līdzekļiem kas satur balinātāju. Brīdinājumus un piesardzības pasākumus skatiet 10. lpp.

† Kā konservantu satur nātrija azīdu.

Nepieciešamie materiāli, kas netiek nodrošināti

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (DDL), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

Reāģenti

- Ksilols
- Etanols (96–100%)*

Palīgmateriāli

- Ja tiek pieņemts lēmums neizmantot komplektā iekļautos stobriņus, ieteicams izmantot 1,5 ml vai 2 ml mikrocentrifūgas stobriņus (līzei) un 1,5 ml mikrocentrifūgas stobriņus (eluēšanai) (pieejami no Eppendorf® [Safe-Lock: Kat. Nr. 022363204, ASV; Kat. Nr. 0030 120.086, Eiropa] vai Sarstedt [Kat. Nr. 72.690]). Ieteicams izmantot RNāzi/DNāzi nesaturošus koniskus stobriņus ar cieši noslēdzamiem vāciņiem.
- Pipetes un pipešu uzgaļi (lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas, ļoti ieteicams izmantot pipešu uzgaļus ar aerosola barjerām)

Aprīkojums

- Ierīce Thermomixer[†], apsildāms orbitāls inkubators, sildīšanas bloks vai ūdens pelde, kurā var inkubēt 56 °C, 70 °C un 90 °C temperatūrā
- Mikrocentrifūga[†] ar rotoru 2 ml stobriņiem
- Virpuļmaisītājs

* Neizmantojiet denaturētu spirtu, kas satur papildvielas, piemēram, metanolu vai metilētilketonu.

[†] Lai nodrošinātu, ka paraugi tiek pareizi apstrādāti QIAamp DSP DNA FFPE procedūrās, ļoti ieteicams instrumentus kalibrēt atbilstoši ražotāju ieteikumiem.

Brīdinājumi un piesardzības pasākumi

Lietošanai in vitro diagnostikā

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai iegūtu papildinformāciju, skatiet attiecīgās drošības datu lapas (DDL). Tās ērtā un kompaktā PDF formātā ir pieejamas vietnē **www.qiagen.com/safety**, kur katram QIAGEN® komplektam un tā sastāvdaļām var atrast, apskatīt un izdrukāt DDL.



UZMANĪBU! NEPIEVIENOJIET balinātāju vai skābus šķīdumus tieši paraugu sagatavošanas atkritumiem.

Buferšķīdumi Buffer AL un Buffer AW1 satur guanidīna hidrohlorīdu, kas, kombinējot ar balinātāju, var veidot augstas reaģētspējas savienojumus.

Ja šķidrums, kas satur šos buferšķīdumus, ir izšķakstīts, notīriet to ar piemērotu laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni. Ja izšķakstītais šķidrums satur potenciāli infekciozas vielas, vispirms notīriet skarto vietu ar laboratorijas mazgāšanas līdzekli un ūdeni un pēc tam ar 1% (tilpumkoncentrācija) nātrija hipohlorītu.

Uz QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit sastāvdaļām attiecas tālāk norādītie bīstamības un piesardzības pasākumu paziņojumi.

Buffer AL



Satur: guanidīna hidrohlorīdu, maleīnskābi. Brīdinājums! Var būt kaitīgs norijot vai ieelpojot. Izraisa ādas kairinājumu. Izraisa nopietnu acu kairinājumu. Var izraisīt alerģisku ādas reakciju. Ja acu kairinājums saglabājas, Meklējiet medicīnisku konsultāciju/palīdzību. JA IEKĻŪST ACIS, uzmanīgi skalojiet ar ūdeni vairākas minūtes. Izņemiet kontaktlēcas, ja tās ir ieliktas un tās var vienkārši izņemt. Turpiniet skalošanu. Novelciet kontaminēto apģērbu un izmazgājiet to pirms atkārtotas lietošanas. JA NOKĻŪST UZ ĀDAS (vai matiem), mazgājiet ar lielu daudzumu ziepēm un ūdeni. Ja ir ādas kairinājums: Meklējiet medicīnisku konsultāciju/palīdzību. Valkājiet aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsargus/sejas aizsargus.

Buffer ATL



Brīdinājums! Izraisa mērenu ādas kairinājumu. Ja ir ādas kairinājums: Meklējiet medicīnisku konsultāciju/palīdzību.

Buffer AW1



Satur: guanidīna hidrohlorīdu. Brīdinājums! Kaitīgs, norijot vai ieelpojot. Izraisa ādas kairinājumu. Izraisa nopietnu acu kairinājumu. Ja nejutāties labi, zvaniet SLIMĪBU PROFILAKSES UN KONTROLES CENTRAM vai ārstam/ģimenes ārstam. Izmetiet saturu/konteineru, to nododot apstiprinātai atkritumu pārstrādes rūpnīcai. Novelciet kontaminēto apģērbu un izmazgājiet to pirms atkārtotas lietošanas. Valkājiet aizsargcimdus/aizsargapģērbu/acu aizsargus/sejas aizsargus.

Proteināze K



Satur: Proteināze K. Bīstami! Izraisa mērenu ādas kairinājumu. Ja ieelpo, var izraisīt alerģiju vai astmas simptomus, vai apgrūtināt elpošanu. Izvairīties ieelpot putekļus/tvaikus/gāzi/dūmus/izgarojumus/smidzinājumu. Izmetiet saturu/konteineru, to nododot apstiprinātai atkritumu pārstrādes rūpnīcai. Ja rodas elpceļu simptomi, zvaniet SLIMĪBU PROFILAKSES UN KONTROLES CENTRAM vai ārstam/ģimenes ārstam. IEELPOŠANAS GADĪJUMĀ: ja elpošana ir apgrūtināta, izvediet cietušo svaigā gaisā un turiet miera stāvoklī, kas ir ērts elpošanai. Izmantojiet elpceļu aizsardzības līdzekļus.

Reaģentu glabāšana un lietošana

QIAamp MinElute stobriņi pēc atvešanas jāuzglabā 2–8 °C temperatūrā, un tos var izmantot līdz derīguma termiņa beigām, kas norādīts uz komplekta kastes.

Visus buferšķīdumus var uzglabāt istabas temperatūrā (15–25 °C), un tie ir stabili līdz komplekta derīguma termiņa beigām. Tomēr pagatavotos buferšķīdumus Buffer AW1 un AW2 var uzglabāt istabas temperatūrā (15–25 °C) ne ilgāk kā 1 gadu vai līdz komplekta derīguma termiņa beigām, izvēloties to, kurš ir īsāks.

Komplektā QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ietilpst lietošanai gatavs proteināzes K šķīdums, kas tiek piegādāts īpaša sastāva uzglabāšanas buferšķīdumā. Proteināze K ir stabila līdz komplekta derīguma termiņa beigu datumam, ja tiek uzglabāta istabas temperatūrā (15–25 °C).

Paraugu materiāla apstrāde un uzglabāšana

Lai ierobežotu DNS sadrumstalošanos, jāizmanto standarta formalīna fiksācijas un parafīna iegulšanas procedūra, līdz ar to veiciet tālāk norādītās darbības.

- Pēc iespējas drīzāk pēc ķirurģiskas noņemšanas nofiksējiet audu paraugus formalīnā saskaņā ar laboratorijas protokolu (pārsvārā tiek izmantots 10 % neitrāls formalīna buferšķīdums).
- Fiksācijas laikam jābūt 14–24 stundas. Ierobežojiet fiksācijas laiku, jo ilgstoša fiksācija (piemēram, > 24 stundas) var izraisīt lielāku DNS sadrumstalošanos, līdz ar to pakārtoto analīžu veikspēja var būt nepietiekama.
- Pirms iegulšanas rūpīgi dehidrējiet paraugus (lieks formalīns var ierobežot proteināzes K noārdīšanos).

DNS tiek eluētas buferšķīdumā Buffer ATE, un tās uzreiz ir gatavas lietošanai amplifikācijas reakcijās vai glabāšanai (apstākļi ir atkarīgi no lietotāja vajadzībām). Ieteiktos glabāšanas nosacījumus konkrētām QIAGEN pakārtotajām analīzēm skatiet attiecīgajās komplekta rokasgrāmatās.

Procedūra

Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- Visus komplektā QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit iekļautos reaģentus ir paredzēts lietot tikai ar citiem tā paša komplekta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit reaģentiem. Ja ir vēlama optimāla veiktspēja, komplektā esošos reaģentus nedrīkst aizstāt.
- Saņemot komplektu, pārbaudiet, vai neviens tā komponents nav bojāts. Ja komplekts vai buferšķīduma pudeles ir bojātas, sazinieties ar QIAGEN tehniskās palīdzības dienestu vai vietējo izplatītāju. Ja ir izšķakstīts šķidrums, skatiet sadaļu “Brīdinājumi un piesardzības pasākumi”, 10. lpp.). Nelietojiet bojātos komplekta komponentus, jo tie var radīt nepietiekamu komplekta veiktspēju.
- Nelietojiet komplekta komponentus no citiem komplektiem kopā ar komplektu, kuru pašlaik izmantojat, ja vien partiju numuri nav identiski.
- Izvairieties no komplekta reaģentu kontaminācijas ar mikrobiem.
- Šo komplektu drīkst izmantot tikai personāls, kas ir apmācīts veikt *in vitro* diagnostiku laboratorijas praksē.
- Strādājot ar reaģentiem un paraugiem, vienmēr valkājiet lateksa vai vinila cimdus, lai novērstu kontamināciju no ādas virsmas vai putekļaina laboratorijas aprīkojuma. Uz rokām un putekļu daļiņām var būt baktērijas un pelējuma sēnītes, kas ir bieži sastopamie kontaminācijas avoti. Bieži mainiet cimdus un turiet stobriņus noslēgtus.
- Neizlietotie buferšķīdumi, caurplūdes un paraugu atlikumi jālikvidē saskaņā ar vietējām procedūrām.
- Ja izmantojat savus plastmasas izstrādājumus, visas izdalīšanas procedūras laikā ieteicams izmantot DNāzi/RNāzi nesaturošus vienreizējās lietošanas polipropilēna 1,5–2 ml koniskus stobriņus ar zemu saistīšanos un cieši aizveramiem vāciņiem.
- Visas centrifugēšanas darbības veiciet istabas temperatūrā (15–25 °C).
- Visi buferšķīdumi jāuzglabā istabas temperatūrā (15–25 °C), un pirms lietošanas tie labi jāsamaisa.

- Iestatiet termomaisītāju vai apsildāmo orbitāla inkubatoru 56 °C temperatūrā 11. darbības veikšanai. Ja termomaisītājs vai apsildāmais orbitāla inkubators nav pieejams, to vietā var izmantot sildīšanas bloku vai ūdens peldi.
- Ja buferšķīdumi Buffer AL vai Buffer ATL satur nogulsnes, izšķīdiniet tās, karsējot 70 °C temperatūrā un viegli maisot.
- Pārliecinieties, ka ir sagatavoti buferšķīdumi Buffer AW1 un Buffer AW2 atbilstoši tālāk minētajiem norādījumiem.
- Kvalitātes kontroles procedūrās uzņēmumā QIAGEN katrai komplekta partijai tiek veikta funkcionālā komplekta izlaišanas pārbaude. Tāpēc nejauciet reaģentus no dažādām komplektu partijām un nejauciet atsevišķus reaģentus no dažādām reaģentu partijām.

Buferšķīdumu sagatavošana

Buferšķīduma Buffer ATL sagatavošana

- Pirms procedūras sākšanas pārbaudiet, vai buferšķīdumā Buffer ATL nav izveidojušās nogulsnes. Ja nepieciešams, izšķīdiniet, karsējot 70 °C temperatūrā un viegli samaisot.

Buferšķīduma Buffer AL sagatavošana

- Pirms procedūras sākšanas pārbaudiet, vai buferšķīdumā Buffer AL nav izveidojušās nogulsnes. Ja nepieciešams, izšķīdiniet, karsējot 70 °C temperatūrā un viegli samaisot.

Buferšķīduma Buffer AW1 sagatavošana

- Pievienojiet 25 ml etanola (96–100 %) pudelei, kas satur 19 ml koncentrēta buferšķīduma Buffer AW1. Atzīmējiet rūtiņu pudeles etiķetē, lai norādītu, ka ir pievienots etanols. Pagatavoto buferšķīdumu Buffer AW1 var uzglabāt istabas temperatūrā (15–25 °C) ne ilgāk kā 1 gadu vai līdz komplekta derīguma termiņa beigām atkarībā no tā, kurš ir īsāks. Uz buferšķīduma etiķetes ieteicams uzrakstīt pagatavošanas datumu.

Piezīme. Pirms procedūras sākšanas samaisiet pagatavoto buferšķīdumu Buffer AW1, to sakratot.

Bufēršķīduma Buffer AW2 sagatavošana

- Pievienojiet 30 ml etanola (96–100 %) pudelei, kas satur 13 ml koncentrēta buferšķīduma Buffer AW2. Atzīmējiet rūtiņu pudeles etiķetē, lai norādītu, ka ir pievienots etanols. Pagatavoto buferšķīdumu Buffer AW2 var uzglabāt istabas temperatūrā (15–25 °C) ne ilgāk kā 1 gadu vai līdz komplekta derīguma termiņa beigām atkarībā no tā, kurš ir īsāks. Uz buferšķīduma etiķetes ieteicams uzrakstīt pagatavošanas datumu.

Piezīme. Pirms procedūras sākšanas samaisiet pagatavoto buferšķīdumu Buffer AW2, to sakratot.

Sākotnējais materiāls

DNS izdalīšanai paredzētais sākotnējais materiāls ir FFPE audu sagrieztās daļas (vislabāk, ja tās ir tikko grieztas). Vairākas daļas var apvienot vienā preparātā. Ja informācija par sākotnējo materiālu nav pieejama, ieteicams sākt darbu ar ne vairāk kā trīs daļām vienā preparātā.

Lietotājam, veicot jebkuru savā laboratorijā izmantojamo procedūru, ir jāoptimizē daļu skaits, daļu biezums un to virsmas laukums. Ja komplektu izmanto kopā ar QIAGEN pakārtotās analīzes veikšanai, norādījumus skatiet attiecīgajā rokasgrāmatā.

Apstrādes procedūra, lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas

Nukleīnskābju amplifikācijas tehnoloģijas ir ļoti jutīgas, tāpēc, apstrādājot QIAamp MinElute stobriņus, ir jāievēro tālāk aprakstītie piesardzības pasākumi, lai izvairītos no krusteniskās kontaminācijas starp paraugiem.

- Nepārpildiet stobriņus ar audiem.
- Veicot audu nokasīšanu, mainiet skalpeli starp paraugiem.

- Uzmanīgi pārnesiet paraugu vai šķīdumu QIAamp MinElute stobriņā. Pipetējiet paraugu QIAamp MinElute stobriņā, nesamitrinot stobriņa malu.
- Starp šķīdumu pārvešanas reizēm vienmēr nomainiet pipešu uzgaļus. Ieteicams izmantot pipešu uzgaļus ar aerosola barjeru.
- Veicot paraugu skalošanas darbības, vienmēr izmantojiet jaunus skalošanas stobriņus.
- Pirms maisīšanas un centrifugēšanas pārļiecinieties, ka stobriņu vāciņi ir pilnībā aizvērti.
- Pirms centrifugēšanas pārļiecinieties, ka QIAamp MinElute stobriņš ir pilnībā aizvērts.
- Pēc visām īslaicīgās maisīšanas darbībām un inkubācijas 90 °C temperatūrā uz īsu brīdi centrifugējiet mikrocentrifūgas stobriņus, lai no vāciņa iekšpuses atdalītu pilienus.
- Vienlaikus atveriet tikai vienu QIAamp MinElute stobriņu un uzmanieties, lai neradītu aerosolu.
- Starp paraugiem vienmēr nomainiet skalpeļus.
- Starp šķīdumu pārvešanas reizēm vienmēr nomainiet pipešu uzgaļus. Lai mazinātu krustenisko kontamināciju, ieteicams izmantot pipešu uzgaļus ar aerosola barjeru, kā arī neizmantojiet vairākās darbībās izmantojamās pipetes.
- Vienmēr lietojiet vienreizējās lietošanas cimdus un regulāri pārbaudiet, vai tie nav piesārņoti ar parauga materiālu. Izmetiet cimdus, ja ir aizdomas, ka tie ir kļuvuši piesārņoti.
- Vienlaikus atveriet tikai vienu stobriņu.

Centrifugēšana

QIAamp MinElute stobriņi ir ievietojami lielākajā daļā standarta 1,5–2 ml mikrocentrifūgas stobriņos. Papildu 2 ml skalošanas stobriņi ir jāiegādājas atsevišķi (QIAGEN, Kat. Nr. 19201). QIAamp MinElute stobriņu centrifugēšana tiek veikta ar aptuveno ātrumu 6000 x g, lai samazinātu centrifūgas troksni. Centrifugēšana pilnā ātrumā nepalielinās DNS daudzumu.

Tomēr QIAamp MinElute stobriņu centrifugēšana ar pilnu ātrumu ir nepieciešama divos procedūras posmos: sausās centrifugēšanas posmā pēc membrānu skalošanas un eluēšanas posmā. Centrifugēšana ar pilnu ātrumu ir nepieciešama arī tam, lai pēc apstrādes ar ksilolu un etanola skalošanas posma paraugs nokristu stobriņa apakšā.

Visi centrifugēšanas posmi jāveic istabas temperatūrā (15–25 °C). Zema centrifugēšanas temperatūra var izraisīt suboptimālu ekstrakciju.

QIAamp MinElute stobriņu apstrāde mikrocentrifūgā

- Vienmēr aizveriet QIAamp MinElute stobriņus, pirms to ievietošanas mikrocentrifūgā.
- Ar pipetes galu nepieskarieties QIAamp MinElute stobriņa membrānai.
- Caurplūdes frakcijas var saturēt bīstamus atkritumus, tāpēc tie ir atbilstoši jālikvidē.
- Lai paralēli efektīvi apstrādātu vairākus paraugus, ieteicams piepildīt statīvu ar skalošanas stobriņiem, kuros pēc centrifugēšanas var pārvietot QIAamp MinElute stobriņus. Izmantotos skalošanas stobriņus ar caurplūdēm var izņemt, un centrifūgā uzreiz var ievietot jaunus skalošanas stobriņus ar tajos ietvertiem QIAamp MinElute stobriņiem.
- Nodrošiniet pilnīgu parauga izsekojamību visa procesa laikā.

Izdalīto DNS eluēšana

Pakārtotajās analīzēs, kurās nepieciešami mazi sākotnējie tilpumi (piemēram, dažās PCR analīzēs), koncentrētāks eluāts var paaugstināt analīzes jutību vai arī tas var izraisīt potenciālu inhibitoru koncentrācijas palielināšanos.

Eluēšanas tilpuma pieaugums samazinās DNS koncentrāciju eluātā.

Atgūtais eluāta tilpums var būt par 5 µl mazāks nekā buferšķīduma Buffer ATE tilpums, kas tika izmantots QIAamp MinElute stobriņam. Piemēram, 20 µl eluēšanas tilpums rada ≥ 15 µl eluātu. Atgūtā eluāta tilpums ir atkarīgs no parauga veida.

Lietotāja pienākums ir optimizēt eluēšanas tilpumu visām laboratorijā izmantojamām procedūrām. Ieteicamos eluēšanas tilpumus, kas nepieciešami konkrētajās QIAGEN pakārtotajās analīzēs, skatiet komplekta rokasgrāmatās.

legūtais DNS daudzums var būt palielināts, ja stobriņš tiek inkubēts ar buferšķīdumu Buffer ATE istabas temperatūrā, piemēram, 5 minūtes pirms centrifugēšanas. Eluētās DNS var savākt 1,5 ml eluēšanas stobriņos (ietilpst piegādes komplektācijā). Eluēto DNS glabāšanas apstākļi ir atkarīgi no lietotāja definētajām prasībām. Ieteicamos glabāšanas apstākļus konkrētajām QIAGEN pakārtotajām analīzēm skatiet komplekta rokasgrāmatās.

Protokols: genoma DNS izolēšana no FFPE audu daļām

Procedūra

1. Ar skalpeli noņemiet lieko parafīnu no paraugu bloka.
2. Sagrieziet daļas saskaņā ar standarta laboratorijas praksi (skatiet sadaļu “Sākotnējais materiāls”, 15. lpp.). Lietotājam, veicot jebkuru savā laboratorijā izmantojamo procedūru, ir jāoptimizē daļu skaits, daļu biezums un to virsmas laukums. Nodrošiniet, lai visa procesa laikā tiktu uzturēta paraugu izsekojamība.
3. Izmantojot sterilu skalpeli, nekavējoties nokasiet audus no daļām uz līzes stobriņu (ietilpst piegādes komplektācijā). Nodrošiniet, lai stobriņā tiktu pārnesti visi pieejamie audi. Pievienojiet paraugam 1 ml ksilola, aizveriet vāciņu un enerģiski samaisiet, līdz parafīns ir izšķīdis (piemēram, 10 sekundes). Pārliecinieties, ka stobriņš ir pilnībā aizvērts, lai izvairītos no ksilola izšļakstīšanās, paraugu krusteniskās kontaminācijas un iespējamās saskares ar ksilolu.

Piezīme. Izmantojiet ksilolu velkmes skapjos vai citās atbilstošās izolācijas iekārtās.

4. Lai savāktu audu granulas, centrifugējiet stobriņu pilnā ātrumā aptuveni 2 minūtes istabas temperatūrā. Ja audu granulas nav izveidojušās, atkārtojiet šo posmu.

Piezīme. Zema centrifugēšanas temperatūra var izraisīt suboptimālu ekstrakciju.

5. Noņemiet supernatantu, to pipetējot, un pēc tam izmetiet. Saglabājiet granulas. Supernatants satur ksilolu, kas ir bīstams atkritums, un tas ir jālikvidē saskaņā ar vietējiem noteikumiem.
6. Audu granulām pievienojiet 1 ml etanola (96–100 %) un rūpīgi sajauciet ar virpuļveida kustību.
Etanols izvilks lieko ksilolu no parauga, un tas ir atbilstoši jālikvidē.

7. Centrifugējiet maksimālajā ātrumā vismaz 2 minūtes istabas temperatūrā.

Noņemiet supernatantu, to pipetējot. Nenoņemiet granulas.

Uzmanīgi noņemiet lieko etanolu, izmantojot smalku pipetes uzgali. Atveriet stobriņu un inkubējiet 15–40 °C temperatūrā, līdz viss liekais etanols ir iztvaikojis. Lai ekstrakcija būtu veiksmīga, atlikušais etanols ir obligāti jānoņem.

Piezīme. Zemāka inkubācijas temperatūra palēnina iztvaikošanas laiku, savukārt augstāka temperatūra var pāržāvēt granulas, padarot tās grūti suspendējamas.

8. Atkārtoti iemērciet granulu 180 µl buferšķīduma Buffer ATL. Pievienojiet 20 µl proteināzi K un sajauciet ar virpuļveida kustību.

Piezīme. Granulām jābūt pietiekami resuspendētām buferšķīdumā Buffer ATL, lai nodrošinātu maksimālo DNS daudzuma atgūstamību.

9. Inkubējiet 56 °C ± 3 °C temperatūrā aptuveni 1 stundu (līdz paraugs ir pilnībā lizēts).

10. Inkubējiet 90 °C ± 5 °C temperatūrā 1 stundu ± 5 minūtes.

Inkubācija 90 °C temperatūrā buferšķīdumā Buffer ATL daļēji atceļ nukleīnskābju formaldehīda pārveidošanu. Īsāki inkubācijas laiki vai zemākas inkubācijas temperatūras var ietekmēt DNS kvalitāti un daudzumu. Ja izmantojat tikai vienu sildīšanas bloku, pēc inkubācijas 56 °C temperatūrā atstājiet paraugu istabas temperatūrā, līdz sildīšanas blokā tiek sasniegta 90 °C temperatūra.

11. Centrifugējiet stobriņu īsu brīdi, lai atdalītu pilienus vāka iekšpusē.

12. Pievienojiet 200 µl buferšķīduma Buffer AL paraugam un rūpīgi sajauciet ar virpuļveida kustību. Tad pievienojiet 200 µl etanola (96–100 %) un vēlreiz rūpīgi sajauciet ar virpuļveida kustību.

Lai iegūtu viendabīgu šķīdumu, paraugs, buferšķīdums Buffer AL un etanols ir jā sajauc nekavējoties un rūpīgi ar virpuļveida kustību vai pipetējot. Buferšķīdumu Buffer AL un etanolu var iepriekš sajaukt un pievienot vienā posmā, lai ietaupītu laiku, apstrādājot vairākus paraugus. Pievienojot buferšķīdumu Buffer AL un etanolu, var veidoties baltas nogulsnes. Šīs nogulsnes neietekmē QIAamp procedūru. Vienmēr izmantojiet svaigu maisījumu un pēc izmantošanas uzreiz izmetiet.

13. Centrifugējiet stobriņu īsu brīdi, lai atdalītu pilienus vāka iekšpusē.
14. Uzmanīgi pārnesiet visu lizātu uz QIAamp MinElute stobriņu (2 ml skalošanas stobriņā), nesamitrinot malu, aizveriet vāciņu un centrifugējiet ar aptuveno ātrumu $6000 \times g \geq 1$ minūti. Ievietojiet QIAamp MinElute stobriņu tīrā 2 ml skalošanas stobriņā (ietilpst piegādes komplektācijā) un izmetiet skalošanas stobriņu, kas satur caurplūdi.
- Ja lizāts pēc centrifugēšanas nav pilnībā izgājis cauri membrānai, atkal centrifugējiet ar lielāku ātrumu, līdz QIAamp MinElute stobriņš ir tukšs.
15. Uzmanīgi atveriet QIAamp MinElute stobriņu un pievienojiet 500 μ l pagatavotā buferšķīduma Buffer AW1, nesamitrinot malu. Aizveriet vāciņu un centrifugējiet ar aptuveno ātrumu $6000 \times g \geq 1$ minūti. Ievietojiet QIAamp MinElute stobriņu tīrā 2 ml skalošanas stobriņā un izmetiet skalošanas stobriņu, kas satur caurplūdi.
16. Uzmanīgi atveriet QIAamp MinElute stobriņu un pievienojiet 500 μ l pagatavotā buferšķīduma Buffer AW2, nesamitrinot malu. Aizveriet vāciņu un centrifugējiet ar aptuveno ātrumu $6000 \times g \geq 1$ minūti. Ievietojiet QIAamp MinElute stobriņu tīrā 2 ml skalošanas stobriņā un izmetiet skalošanas stobriņu, kas satur caurplūdi.
- Izvairieties no QIAamp MinElute stobriņa saskares ar caurplūdi. Neaizmirstiet līdzsvarot centrifūgas rotoru. Daži centrifūgas rotoru palēnināšanās laikā var vibrēt, kā rezultātā caurplūde, kas satur etanolu, nonāk saskarē ar QIAamp MinElute stobriņu. Izņemiet QIAamp MinElute stobriņu un skalošanas stobriņu no rotora uzmanīgi, lai caurplūde nesaskartos ar QIAamp MinElute stobriņu.
17. Lai izžāvētu membrānu, centrifugējiet pilnā ātrumā (aptuveni $20\,000 \times g$) apmēram 3 minūtes.
- Etanola pārnese uz eluātu var ietekmēt dažu pakārtotu analīžu darbību.

18. Ievietojiet QIAamp MinElute stobriņu tīrā 1,5 ml eluēšanas stobriņā (ietilpst komplektācijā) un izmetiet skalošanas stobriņu, kas satur caurplūdi. Uzmanīgi atveriet QIAamp MinElute stobriņa vāciņu un membrānas centrā uzklājiet 20–200 µl buferšķīduma Buffer ATE.

SVARĪGI! Izmantojot mazus eluēšanas tilpumus (< 50 µl), uzklājiet buferšķīdumu Buffer ATE membrānas centrā, lai nodrošinātu pilnīgu piesaistīto DNS eluēšanu. QIAamp MinElute stobriņi ir piemēroti dažādiem eluēšanas tilpumiem. Izvēlieties tilpumu atkarībā no pakārtotajā analīzē piemērojamām prasībām. Eluāta tilpums būs aptuveni par 5 µl mazāks nekā eluēšanas šķīduma tilpums, kas izmantots stobriņam.

19. Aizveriet vāciņu un inkubējiet istabas temperatūrā (15–25 °C) vismaz 1 minūti. Centrifugējiet ar pilnu ātrumu (aptuveni 20 000 x g) ≥ 1 minūti.

QIAamp MinElute stobriņa inkubācija ar buferšķīdumu Buffer ATE aptuveni 5 minūtes istabas temperatūrā pirms centrifugēšanas var palielināt DNS daudzumu.

Kvalitātes kontrole

Atbilstoši ISO prasībām sertificētajai QIAGEN kvalitātes vadības sistēmai katra komplektu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits partija ir pārbaudīta, salīdzinot ar iepriekš noteiktām specifikācijām, lai nodrošinātu pastāvīgu produkta kvalitāti.

Ierobežojumi

Komplekta veiktspēja tika noteikta, izmantojot formalinā fiksētus un parafinā iegultus audus (FFPE audus) genoma DNS izolēšanai.

Lietotāja pienākums ir pārbaudīt sistēmas veiktspēju attiecībā uz visām viņa laboratorijā izmantotajām procedūrām, kas nav ietvertas rokasgrāmatā aprakstītajos QIAGEN veiktspējas pētījumos.

Lai samazinātu negatīvas ietekmes uz diagnostikas rezultātiem risku, pakārtotiem lietojumiem ir jāizmanto atbilstoši kontrolmateriāli. Lai iegūtu papildu informāciju par validāciju, ieteicams skatīt Starptautiskās konferences par tehnisko prasību saskaņošanu (International Conference on Harmonization, ICH) sagatavotās vadlīnijas ICH Q2(R1) "Analīžu procedūru validācija: teksts un metodoloģija".

Visi iegūtie diagnostikas rezultāti jāinterpretē kopā ar citiem klīniskām vai laboratoriskām atradnēm.











Izmantojot komplektu QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit, RNS var tikt izdalītas līdz ar DNS, ja tās ir iekļautas paraugā.











Veiktspējas raksturojums

Komplekta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit veiktspējas raksturojumu skatiet vietnē www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.

Simboli

Uz iepakojuma un marķējuma var būt šādi simboli:

Simbols	Simbola definīcija
 Σ <N>	Satur reagentus, kuru daudzums ir pietiekams <N> reakcijām
	Izlietot līdz
 IVD	In vitro diagnostikas medicīnas ierīce
	Saņemot
 REF	Kataloga numurs
 LOT	Partijas numurs
 MAT	Materiāla numurs
 COMP	Komponenti
 CONT	Satur
 NUM	Numurs

Simbols	Simbola definīcija
	Pēc etanola pievienošanas pudeles saturam pierakstiet pašreizējo datumu
	Etanols
	Jāpievieno
	Guanidīna hidrohlorīds
	Maleīnskābe
	Globālais tirdzniecības identifikācijas numurs
	Temperatūras ierobežojums
	Ražotājs
	Skatīt lietošanas norādījumus
	Uzmanību!

Kontaktinformācija

Lai saņemtu tehnisku palīdzību un papildu informāciju, lūdzu apskatiet mūsu tehniskā atbalsta centra vietni www.qiagen.com/Support, zvaniet pa tālruņa numuru 00800-22-44-6000 vai sazinieties ar kādu no QIAGEN tehnisko pakalpojumu dienesta nodaļām (skatiet aizmugurējo vāku vai apmeklējiet vietni www.qiagen.com).

Informācija pasūtīšanai

Produkts	Saturs	Kat. nr.
Komplekts QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit — genoma DNS izdalīšanai no parafinā iegultiem audiem		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNS sagatavošanai: 50 QIAamp MinElute® Columns, proteināze K buferšķīdumi, skalošanas stobriņi (2 ml), eluēšanas stobriņi (1,5 ml), līzes stobriņi (2 ml)	60404

Jaunāko informāciju par licencēšanu un preču juridiskās atrunas skatīt attiecīgā QIAGEN komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja rokasgrāmatā. QIAGEN komplektu rokasgrāmatas un lietotāja rokasgrāmatas ir pieejamas vietnē www.qiagen.com, kā arī tās var pieprasīt QIAGEN tehniskā atbalsta centros vai pie vietējiem izplatītājiem.

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

Ierobežotās licences līgums komplekta QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit rokasgrāmatai

Šī produkta izmantošana liecina par katra produkta pircēja vai lietotāja piekrišanu tālāk minētajiem nosacījumiem.

1. Šo produktu drīkst lietot tikai saskaņā ar kopā ar produktu nodrošinātajiem protokoliem un šo rokasgrāmatu un tikai kopā ar sastāvdaļām, kas ietilpst šajā komplektā. Uzņēmums QIAGEN nepiešķir nekāda veida licenci uz nevienu no tā intelektuālajiem īpašumiem, lai šajā komplektā ietvertās sastāvdaļas izmantotu kopā ar jebkādām sastāvdaļām, kas neietilpst šajā komplektā, vai ar tām apvienotu, izņemot gadījumus, kas aprakstīti kopā ar produktu piegādātajos protokolos un šajā rokasgrāmatā, kā arī papildu protokolos, kas pieejami tīmekļa vietnē www.qiagen.com. Dažus no šiem papildu protokoliem QIAGEN lietotāji nodrošina QIAGEN lietotājiem. Šie protokoli nav rūpīgi testēti vai optimizēti uzņēmumā QIAGEN. Uzņēmums QIAGEN nedz apliecina, nedz garantē, ka tie nepārkāpj trešo personu tiesības.

2. Uzņēmums QIAGEN nesniedz citas garantijas, izņemot skaidri norādītās licences, ka šis komplekts un/vai tā lietošana neaizskar trešo personu tiesības.

3. Šis komplekts un tā sastāvdaļas ir licencētas vienreizējai lietošanai, un tās nedrīkst izmantot atkārtoti, atjaunot vai pārdot tālāk.

4. Uzņēmums QIAGEN īpaši atsakās no jebkādām citām tiesībām vai netiešām licencēm, kas nav skaidri norādītas.

5. Komplekta pircējs un lietotājs piekrīt neveikt un neatļaut citiem veikt nekādas darbības, kas varētu izraisīt vai veicināt jebkuras no iepriekš aizliegtajām darbībām. Uzņēmums QIAGEN var pieprasīt šī ierobežotā licences līguma aizliegumu īstenošanu jebkurā tiesā un apņemas atgūt visus savus izmeklēšanas un tiesas izdevumus, ieskaitot advokātu honorārus, kas radušies, īstenojot šo ierobežoto licences līgumu vai jebkuru no uzņēmuma intelektuālā īpašuma tiesībām saistībā ar komplektu un/vai tā sastāvdaļām.

Jaunākos licences nosacījumus skatiet tīmekļa vietnē www.qiagen.com.

Feb-17 HB-0414-004 © 2017, QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

Pasūtīšana www.qiagen.com/contact | Tehniskais atbalsts support.qiagen.com | Tīmekļa vietne www.qiagen.com