

Agosto 2017

# Istruzioni per l'uso (manuale) del kit RNeasy<sup>®</sup> DSP FFPE



Versione 1  
Per uso diagnostico in vitro

**IVD** Per uso diagnostico in vitro



**REF** 73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1 **MAT** 1106945IT

# Indice

Uso previsto .....	3
Riassunto e spiegazione .....	3
Principi della procedura .....	4
Materiali in dotazione .....	6
<b>Contenuto del kit</b> .....	<b>6</b>
Materiali necessari ma non in dotazione .....	7
Avvertenze e precauzioni .....	8
Conservazione e manipolazione dei reagenti .....	10
<b>Componenti del kit</b> .....	<b>10</b>
Note importanti .....	11
Preparazione dei tamponi .....	12
Procedura .....	14
<b>Protocollo: Purificazione dell'RNA totale da sezioni di tessuto FFPE</b> .....	<b>15</b>
Controllo di qualità .....	19
Limitazioni .....	19
Simboli .....	20
Guida alla risoluzione dei problemi .....	22
Appendice: Note generali per la manipolazione dell'RNA .....	24
<b>Informazioni per gli ordini</b> .....	<b>26</b>

---

## Uso previsto

Il kit RNeasy DSP FFPE è un sistema studiato per la purificazione dell'RNA totale da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (formalin-fixed, paraffin embedded, FFPE).

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare.

Dispiega un protocollo ottimizzato basato su colonnina spin in silice e include la rimozione enzimatica del DNA residuo.

Il kit RNeasy DSP FFPE è studiato per l'uso diagnostico in vitro.

## Riassunto e spiegazione

Il kit RNeasy DSP FFPE è concepito appositamente per la purificazione dell'RNA totale da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE). Isolando le molecole di RNA più lunghe di 70 nucleotidi, il kit fornisce il recupero di frammenti di RNA utilizzabili per applicazioni a valle come RT-PCR.

A causa delle condizioni di fissazione e inclusione, gli acidi nucleici nei campioni FFPE sono di solito frammentati e modificati chimicamente dalla formaldeide. Pertanto gli acidi nucleici isolati da campioni FFPE presentano spesso un peso molecolare inferiore a quelli ottenuti da campioni freschi o congelati. Il grado di frammentazione dipende, oltre che dal tipo e dall'età del campione, dalle condizioni per la fissazione, l'inclusione e la conservazione del campione. Per la standardizzazione dei processi di verifica preliminare per i tessuti FFPE si consiglia di procedere secondo lo standard CEN CEN/TS 16827-1\_2015.

---

Sebbene la trasformazione della formaldeide non possa essere rilevata in saggi standard nell'ambito del controllo di qualità, come elettroforesi su gel o analisi con lab-on-a-chip, la sua interferenza con le analisi enzimatiche è notevole.

Mentre il kit RNeasy DSP FFPE è ottimizzato per invertire quanto più possibile la trasformazione della formaldeide senza un'ulteriore degradazione dell'RNA, gli acidi nucleici purificati da campioni FFPE non devono essere utilizzati in applicazioni a valle che richiedono RNA a piena lunghezza. Alcune applicazioni possono richiedere modifiche per consentire l'utilizzo di RNA frammentato (p. es., mettendo a punto piccoli ampliconi per RT-PCR). Per la sintesi del cDNA si devono utilizzare primer random o specifici del gene invece di primer oligo-dT.

La colorazione delle sezioni FFPE può anche compromettere la qualità e le prestazioni dell'RNA nelle applicazioni a valle. Ciò è vero, in particolare, per molti protocolli di colorazione immunohistochimica

## Principi della procedura

La procedura RNeasy DSP FFPE impiega la consolidata tecnologia RNeasy technology per la purificazione dell'RNA. Condizioni di lisi specificamente ottimizzate permettono l'effettiva purificazione dell'RNA totale da sezioni di tessuto FFPE. La fase di digestione con DNasi I elimina efficacemente la contaminazione del DNA, comprese le molecole altamente frammentate.

In primo luogo viene rimossa tutta la paraffina da sezioni appena tagliate di tessuto FFPE mediante trattamento con soluzione di deparaffinazione. Successivamente i campioni vengono incubati in un tampone di lisi ottimizzato, che contiene proteinasi K per liberare l'RNA dalle sezioni. Una breve incubazione a una temperatura più elevata inverte parzialmente la formazione di legami crociati (crosslinking) con la formalina degli acidi nucleici liberati, migliorando la resa e la qualità dell'RNA, nonché le prestazioni dell'RNA nei saggi enzimatici a valle. L'incubazione è seguita da un trattamento con DNasi I ottimizzato per eliminare il DNA genomico, compresi frammenti molto piccoli di DNA che

sono spesso presenti nei campioni FFPE dopo una prolungata fissazione in formalina e/o tempi di conservazione prolungati. Successivamente il lisato viene mescolato con il tampone RBC. L'etanolo viene aggiunto per fornire opportune condizioni per il legame dell'RNA e il campione viene quindi applicato a una colonnina spin RNeasy MinElute, dove l'RNA totale si lega alla membrana e i contaminanti vengono eliminati in modo efficiente. L'RNA viene quindi eluito in un minimo di 14 µl di acqua priva di RNasi.

### Procedura RNeasy DSP FFPE

Sezioni di tessuto FFPE

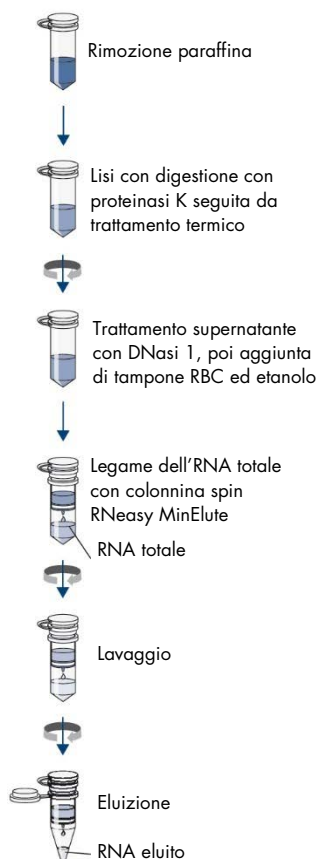


Figura 1. Procedura di purificazione dell'RNA da tessuto FFPE con utilizzo del kit RNeasy DSP FFPE.

# Materiali in dotazione

## Contenuto del kit

<b>Kit RNeasy DSP FFPE</b>			<b>(50)</b>
<b>N° di catalogo</b>			<b>73604</b>
<b>Numero di preparazioni</b>			<b>50</b>
	Descrizione	Simboli	Quantità
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (Colonnine spin RNeasy MinElute®) (rosa) (ciascuna in una provetta da raccolta da 2 ml)	<b>COL</b>	50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (2 ml)	<b>LYS TUBE</b>	150
WT	Wash Tubes (Provette di lavaggio) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	250
DPS	Deparaffinization Solution (Soluzione di deparaffinazione)	<b>DEPAR SOL</b>	20 ml
RBC	Buffer RBC* (Tampone RBC)	<b>BIND BUF</b>	45 ml
PKD	Buffer PKD (Tampone PKD)	<b>PROTK DIL</b>	15 ml
PK	Proteinase K (Proteinasi K)	<b>PROTK</b>	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (lyophilized) (DNasi priva di RNasi (liofilizzata))	<b>DNase</b>	1
RNFW	RNase-Free Water (Acqua priva di RNasi)	<b>ELU DIL</b>	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer (Tampone di amplificazione per DNasi)	<b>DNase BUF</b>	2 ml
RPE	Buffer RPE† (concentrate) (Tampone RPE (concentrato))	<b>WASH BUF CONC</b>	11 ml
HB, v1	RNeasy DSP FFPE Kit Handbook (Manuale kit RNeasy DSP FFPE)		1

\*Contiene sale della guanidina. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per le informazioni di sicurezza, consultare pag. 8.

†Prima di utilizzarlo per la prima volta, aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100 %, non denaturato), come indicato sul flacone e descritto a pag. 12, in modo da ottenere una soluzione di lavoro.

---

## Materiali necessari ma non in dotazione

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

- Puntali per pipette e pipette sterili, privi di RNasi
- Microcentrifuga (con rotore per provette da 2 ml)
- Agitatore vortex
- Etanolo al 100% (non utilizzare alcol denaturato, che contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK)).
- Guanti monouso
- Blocco riscaldante con funzione di agitazione capace di incubare a 56°C e 80°C

# Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il kit.

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione. Per maggiori informazioni consultare le apposite schede di dati di sicurezza (SDS). Le schede SDS in formato PDF sono disponibili online all'indirizzo [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Qui è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

ATTENZIONE

Rischio di lesioni personali



NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.

I tamponi nel kit RNeasy DSP FFPE contengono azoturo di sodio. In caso di fuoriuscita di tamponi del kit, pulire con acqua e detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, quindi con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

Ai componenti del kit RNeasy DSP FFPE sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali.

PKD, RPE, RNF, DBB

Contiene: azoturo di sodio. Attenzione! Può essere nocivo se ingerito. In caso di malore, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.



#### DSP



Contiene: esadecano. Pericolo! Può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione nelle vie respiratorie. L'esposizione ripetuta può provocare secchezza e screpolature della pelle. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti. **NON** provocare il vomito. **IN CASO DI INGESTIONE:** contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Conservare sotto chiave.

#### Proteinase K (proteinasi K)



Contiene: Proteinasi K. Pericolo! Causa lieve irritazione cutanea. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti. In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **IN CASO DI INALAZIONE:** se la respirazione è difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Utilizzare un apparecchio respiratorio.

#### DNasi I



Contiene: Desossiribonucleasi. Pericolo! Può provocare una reazione allergica cutanea. Può provocare sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti. In caso di sintomi respiratori: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. **IN CASO DI INALAZIONE:** se la respirazione è difficile, trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. Utilizzare un apparecchio respiratorio.

#### RBC



Contiene guanidina cloridrato. Attenzione! Nocivo se ingerito o inalato. Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

#### DBB



Contiene: cloruro di calcio; acido cloridrico. Attenzione! Provoca irritazione cutanea. Provoca grave irritazione oculare. Se l'irritazione degli occhi persiste: consultare un medico. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente. **IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE:** lavare delicatamente e abbondantemente con acqua e sapone. In caso di irritazione della pelle: consultare un medico. Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.

---

# Conservazione e manipolazione dei reagenti

DNase I priva di RNasi e colonnine spin RNeasy MinElute devono essere conservate a 2–8°C immediatamente, al momento della consegna. I tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C). In queste condizioni il kit può essere conservato come indicato dalla data di scadenza sull'etichetta della scatola senza alcuna riduzione delle prestazioni.

Non utilizzare il kit RNeasy DSP FFPE se è scaduto.

## Componenti del kit

Le date di scadenza dei reagenti sono indicate sull'etichetta dei singoli componenti. Se il prodotto è conservato correttamente, mantiene inalterate le proprie prestazioni per tutto il periodo di stabilità dichiarato, a condizione che i componenti utilizzati appartengano agli stessi lotti.

Per la conservazione a lungo termine della DNasi I dopo ricostituzione, rimuovere la soluzione madre dalla fiala, suddividerla in aliquote monouso e conservarla tra –15 e –30°C per un periodo non superiore a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C fino a 6 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.

Evitare di esporre i reagenti ai raggi UV (ad es. quelli utilizzati per la decontaminazione), in quanto tale esposizione può causare un invecchiamento accelerato.

---

# Note importanti

## Materiale di partenza

Le procedure standard di fissazione in formalina e inclusione in paraffina comportano sempre una significativa frammentazione e formazione di legami crociati (crosslinking) negli acidi nucleici. Per limitare la portata della frammentazione e formazione di legami crociati nel DNA accertarsi di:

- utilizzare campioni tissutali di spessore inferiore a 5 mm per consentire la penetrazione completa della formalina
- fissare i campioni tissutali in formalina neutra tamponata al 4–10% il più velocemente possibile dopo il prelievo chirurgico
- utilizzare un tempo di fissazione massimo di 24 ore (tempi di fissazione più lunghi comportano sovriffissazione e una più grave frammentazione dell'acido nucleico con conseguente riduzione delle prestazioni dei test a valle)
- Disidratare accuratamente i campioni prima dell'inclusione
- Per l'inclusione utilizzare paraffina bassofondente

Il materiale di partenza per la purificazione dell'RNA deve essere formato da sezioni appena tagliate di tessuto FFPE, ciascuna di spessore inferiore o uguale a 20 µm. Sezioni più spesse possono determinare rese di acido nucleico inferiori, anche dopo una prolungata incubazione con proteinasi K. Fino a 4 sezioni, ciascuna di spessore fino a 10 µm, possono essere combinate in un'unica preparazione. Più di 4 sezioni possono essere combinate se la somma totale dello spessore delle sezioni è pari a 40 µm o inferiore (p. es., otto sezioni di 5 µm di spessore).

Per i tessuti con contenuto di DNA particolarmente elevato si consiglia di utilizzare meno sezioni per preparazione in modo da evitare la contaminazione con DNA dell'RNA purificato.

---

Se non si possiedono informazioni sulla natura del materiale di partenza, si consiglia di iniziare con non più di 2 sezioni per preparazione. A seconda della resa e della purezza dell'RNA può essere possibile utilizzare fino a 4 sezioni nelle successive preparazioni. Tuttavia il sovraccarico della colonnina spin RNeasy MinElute potrebbe ridurre in modo significativo resa e qualità dell'RNA.

## Preparazione dei tamponi

### Preparazione della soluzione madre di DNasi I

Preparare la soluzione madre di DNasi I dissolvendo la DNasi I liofilizzata in 550 µl di acqua priva di RNasi. Per evitare la perdita di DNasi I, non aprire la fiala. Iniettare acqua priva di RNasi nella fiala utilizzando una siringa ad ago priva di RNasi. Miscelare con cautela capovolgendo la fiala. Non utilizzare il vortex.

In alcuni casi la fiala di DNasi I può sembrare vuota. Ciò è dovuto all'enzima liofilizzato attaccato al setto. Per evitare la perdita di DNasi I, non aprire la fiala. Dissolvere invece la DNasi I utilizzando una siringa ad ago come descritto di seguito.

**Nota:** la DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la fiala.

**Nota:** prestare attenzione affinché il volume totale di acqua priva di RNasi sia iniettato nella fiala.

Dopo la dissoluzione della DNasi I può rimanere materiale insolubile. A causa del processo produttivo il materiale insolubile può essere presente nella DNasi I liofilizzata. Ciò non influisce sulle prestazioni della DNasi I.

---

Per la conservazione a lungo termine della DNasi I, rimuovere la soluzione madre dalla fiala, suddividerla in aliquote monouso e conservarla tra  $-15$  e  $-30^{\circ}\text{C}$  per un periodo non superiore a 9 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a  $2-8^{\circ}\text{C}$  fino a 6 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.

### Preparazione del tampone RPE

Aggiungere 4 volumi (44 ml) di etanolo (96–100 %) al flacone contenente 11 ml di tampone RPE concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo.

**Nota:** prima di iniziare la procedura, mescolare il tampone RPE ricostituito scuotendolo.

# Procedura

## Punti importanti prima di iniziare

- Se si usa per la prima volta il kit RNeasy DSP FFPE, leggere “Annotazioni importanti” (pag. 11).
- Se si opera con l’RNA per la prima volta, leggere “Appendice: Note generali per il trattamento dell’RNA” (pag. 24).
- Il tampone RBC contiene un sale della guanidina, pertanto non è compatibile con i reagenti disinfettanti a base di candeggina. Per le informazioni di sicurezza, consultare pag. 8.
- Salvo diversa indicazione, eseguire tutti i passaggi della procedura a temperatura ambiente (15–25°C). Durante la procedura lavorare rapidamente senza fermarsi.
- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione usando una microcentrifuga a 15–25°C. Se si utilizza una microcentrifuga refrigerata, impostare la temperatura a 20–25°C, altrimenti si può verificare un notevole raffreddamento a temperature inferiori a 15°C.
- Nella procedura riportata di seguito, ▲ indica i volumi da utilizzare se si trattano 1–2 sezioni per campione, mentre ● indica i volumi da utilizzare se si trattano >3–4 sezioni per campione.
- Se si utilizzano tampone RPE e DNasi I priva di RNasi per la prima volta, ricostituirli nel modo descritto in “Preparazione di tamponi” (pag. 12)
- Equilibrare tutti i tamponi a temperatura ambiente (15–25°C). Miscelare il tampone RPE ricostituito scuotendolo.
- Impostare un termomiscelatore a 56°C per utilizzarlo nelle fasi 5 e 9. Per ridurre il tempo di attesa, impostare un secondo termomiscelatore a 80°C per l’utilizzo nella fase 9.
- **Nota:** non interrompere la procedura di purificazione, dal momento che tempi di incubazione prolungati potrebbero determinare la perdita o la degradazione dell’RNA. Il tempo medio di trattamento di un massimo di 12 campioni in parallelo è di circa 130 minuti.

## Protocollo: Purificazione dell'RNA totale da sezioni di tessuto FFPE

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocchetto del campione.
  2. Tagliare sezioni di 5–20 µm di spessore.  
Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2–3 sezioni.
  3. Inserire immediatamente le sezioni in una provetta per microcentrifuga da ▲ 1,5 ml o ● 2 ml.
  4. Aggiungere ▲ 160 µl o ● 320 µl di soluzione di deparaffinazione, agitare vigorosamente in vortex per 10 secondi e centrifugare brevemente per consentire al campione di depositarsi sul fondo della provetta.
  5. Incubare a 56°C per 3 minuti, quindi lasciare raffreddare per 5 minuti a temperatura ambiente.  
Se la soluzione di deparaffinazione utilizzata è insufficiente o se si trascina (carryover) troppa paraffina con il campione, la soluzione di deparaffinazione può diventare cerosa o solida dopo il raffreddamento. Se ciò dovesse accadere, aggiungere ulteriori 160 µl di soluzione di deparaffinazione per volta e ripetere il passaggio 5.
  6. Aggiungere ▲ 150 µl o ● 240 µl di tampone PKD, e miscelare con il vortex per 3 secondi.
  7. Centrifugare per 1 minuto a 11.000 x g.
  8. Aggiungere 10 µl di proteinasi K alla fase inferiore, limpida, e miscelare pipettando delicatamente 10 volte verso l'alto e verso il basso (non miscelare fasi separate).
  9. Incubare a 56°C per 15 minuti a 1.100 rpm, quindi a 80°C per 15 minuti a 1.100 rpm.  
Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 80°C.
- Nota:** per la resa massima dell'RNA non è richiesta una digestione completa del tessuto con proteinasi K; è tuttavia decisiva la fase di incubazione a 80°C.

**IMPORTANTE:** Accertarsi che il blocco riscaldante abbia raggiunto la temperatura di 80°C prima di iniziare l'incubazione di 15 minuti. L'incubazione di 15 minuti a 80°C è fondamentale per inversione dei crosslinking della formaldeide e prestazioni ottimali dell'RNA in applicazioni a valle come RT-PCR in tempo reale.

10. Centrifugare brevemente e trasferire ▲ 145 µl o ● 230 µl della fase inferiore, incolore, in una nuova provetta per microcentrifuga da 1,5 ml.

11. Incubare in ghiaccio per 3 minuti. Poi centrifugare per 15 minuti a 20.000 x g.

12. Trasferire il supernatante in una nuova provetta per microcentrifuga da 2 ml prestando attenzione a non far muovere il pellet.

Il pellet contiene detriti di tessuti insolubili, incluso il DNA crosslegato.

13. Aggiungere tampone di amplificazione per DNasi pari a un decimo del volume totale del campione (▲ 14.5 µl o ● 23 µl) e 10 µl di soluzione madre di DNasi I. Miscelare capovolgendo la provetta. Centrifugare brevemente per raccogliere il liquido residuo dai lati della provetta.

**Nota:** la DNasi I è fornita liofilizzata e deve essere ricostituita come descritto in "Preparazione della soluzione madre di DNasi I", pag. 12.

**Nota:** la DNasi I è particolarmente sensibile alla denaturazione. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la provetta. Non utilizzare il vortex.

14. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.

15. Aggiungere ▲ 320 µl o ● 500 µl di tampone RBC per mettere a punto le condizioni per il legame, e mescolare accuratamente il lisato miscelando con il vortex per 3 secondi e centrifugare brevemente.

16. Aggiungere ▲ 720 µl o ● 1200 µl di etanolo (100%) al campione. Non centrifugare. Proseguire immediatamente con la fase 17.

I precipitati possono essere visibili dopo l'aggiunta di etanolo. Ciò non influisce sulla procedura.



17. Miscelare bene pipettando 5 volte verso l'alto e verso il basso e trasferire 700 µl del campione, compreso qualsiasi precipitato eventualmente formatosi, in una colonnina spin RNeasy MinElute collocata in una provetta da raccolta da 2 ml. Chiudere il coperchio delicatamente e centrifugare per 15 secondi a  $\geq 8.000 \times g$ . Smaltire la provetta da raccolta con il flow-through\* e collocare la colonnina in una nuova provetta da raccolta (in dotazione).
18. Ripetere il passaggio 17 (senza miscelazione aggiuntiva) fino a quando l'intero campione abbia attraversato la colonnina spin RNeasy MinElute.
19. Aggiungere 500 µl di tampone RPE sulla colonnina spin RNeasy MinElute. Chiudere il coperchio delicatamente e centrifugare per 15 secondi a  $\geq 8.000 \times g$ . Smaltire la provetta da raccolta con il flow-through\* e collocare la colonnina in una nuova provetta da raccolta (in dotazione).

**Nota:** il tampone RPE viene fornito in forma concentrata. Accertarsi che l'etanolo sia aggiunto prima dell'uso come descritto in "Preparazione del tampone RPE".

20. Aggiungere 500 µl di tampone RPE sulla colonnina spin RNeasy MinElute. Chiudere il coperchio delicatamente e centrifugare per 2 minuti a  $\geq 8.000 \times g$  per lavare la membrana della colonnina spin. Smaltire la provetta da raccolta con il flow-through\* e collocare la colonnina in una nuova provetta da raccolta (in dotazione).

**Nota:** dopo la centrifugazione, rimuovere delicatamente la colonnina RNeasy MinElute Spin dalla provetta di raccolta, impedendo così alla colonnina di entrare in contatto con il flow-through e di causare il carryover dell'etanolo.

\* Il flow-through contiene il tampone RBC e non è pertanto compatibile con la candeggina. Per le informazioni di sicurezza, consultare pag. 8.

---

21. Aprire il coperchio della colonnina spin e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti. Smaltire la provetta da raccolta con il flow-through.

Per evitare di danneggiarne i coperchi, inserire le colonnine spin nella centrifuga lasciando almeno una posizione vuota tra le colonne. Orientare i coperchi in modo che siano rivolti nel senso opposto alla rotazione del rotore (p. es., se il rotore ruota in senso orario, orientare i coperchi in senso antiorario).

È importante asciugare la membrana della colonnina spin perché l'etanolo residuo può interferire con le reazioni downstream. La centrifugazione con i coperchi aperti eviterà il carryover dell'etanolo durante l'eluizione dell'RNA.

22. Inserire la colonnina spin RNeasy MinElute in una nuova provetta da raccolta da 1,5 ml (in dotazione). Aggiungere 14–32 µl di acqua priva di RNasi direttamente al centro della membrana della colonnina spin. Chiudere il coperchio delicatamente e centrifugare per 1 minuto alla massima velocità per eluire l'RNA.

L'eluizione con volumi di acqua priva di RNasi inferiori determina concentrazioni totali dell'RNA più elevate, ma rese di RNA più basse.

**Nota:** per basse rese di RNA previste si consiglia una provetta a basso legame per l'eluizione (non in dotazione). Il volume morto medio della colonnina spin RNeasy MinElute è di 2 µl: l'eluizione con 14 µl di acqua priva di RNasi determina come risultato circa 12 µl di eluato.

23. Conservare gli eluati di RNA tra –60 e –90°C o tra –15 e –30°C per un periodo non superiore a 8 mesi.

---

# Controllo di qualità

Conformemente al Sistema di Gestione della Qualità di QIAGEN, dotato di certificazione ISO, ogni lotto del kit RNeasy DSP FFPE è stato sottoposto a test sulla base di specifiche tecniche predefinite, in modo da garantire la costante qualità del prodotto.

## Limitazioni

Le prestazioni del sistema sono state stabilite in studi di valutazione delle prestazioni della purificazione dell'RNA umano da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni a valle.

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

# Simboli

Nelle presenti istruzioni per l'uso sono utilizzati i simboli riportati nella tabella seguente.



<N>

Contenuto sufficiente per <N> reazioni



Utilizzare entro



Dispositivo medico-diagnostico in vitro



Al momento della consegna



DN



RNeasy MinElute Spin



Numero di catalogo



Codice del lotto



Numero di materiale (p. es., l'etichetta del componente)



Componenti (p. es., un elenco di tutto ciò che è incluso)

**CONT**

Contiene (contenuto)

**NUM**

Numero (ad esempio fiale, flaconi)

**GTIN**

Codice GTIN

**Rn**

“R” indica la revisione delle Istruzioni per l’uso (manuale) e “n” indica il numero della revisione



Limite di temperatura



Produttore



Consultare le istruzioni per l’uso



Cautela

**PROTK**

Proteinasi K

**Sodium azide**

Azoturo di sodio

# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica:

**[www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)**. Gli esperti del servizio di assistenza tecnica di QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni e analisi (per le informazioni sui contatti visitare il sito **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

## Commenti e suggerimenti

---

### Colonnina spin RNeasy MinElute intasata

- |  |  |
|--|--|
| a) Materiale di partenza in eccesso            | Ridurre la quantità di materiale di partenza. È essenziale utilizzare la giusta quantità di materiale di partenza (vedi pag. 11).  |
| b) Temperatura di centrifugazione troppo bassa | La temperatura di centrifugazione deve essere di 15–25°C. Alcune centrifughe possono raffreddarsi a meno di 15°C anche se impostate a 20°C. Ciò può provocare la formazione di precipitati che possono intasare la colonnina spin RNeasy MinElute. Se ciò accade, impostare la temperatura di centrifugazione su 25°C. |

### Bassa resa dell'RNA

- |   |   |
|---|---|
| a) Scarsa qualità del materiale di partenza                             | I campioni che sono stati fissati per oltre 24 ore o sono stati conservati per periodi molto lunghi possono contenere RNA scarsamente utilizzabile. Le sezioni che sono state montate su vetrini per microscopio possono fornire RNA scarsamente utilizzabile a causa dell'esposizione prolungata all'aria. |
| b) Materiale di partenza in eccesso                                     | Il sovraccarico della colonnina spin RNeasy MinElute riduce in modo significativo le rese di acido nucleico. Ridurre la quantità di materiale di partenza (vedi pag. 11).   |
| c) RNA ancora legato alla membrana della colonnina spin RNeasy MinElute | Ripetere l'eluizione dell'RNA, ma incubare la colonnina spin RNeasy Min Elute sul banco per 10 minuti con RNFW prima della centrifugazione.   |
| d) Errata conservazione di tamponi/reagenti                             | Le colonnine spin RNeasy MinElute e la DNasi I devono essere conservati a 2–8°C all'arrivo del kit. Controllare la corretta temperatura di conservazione, poiché l'esposizione a temperature più elevate per periodi prolungati potrebbe determinare la perdita di funzionalità.                            |

## Commenti e suggerimenti

### Basso valore $A_{260}/A_{280}$

- a) Acqua utilizzata per diluire l'acido nucleico per misurazioni di  $A_{260}/A_{280}$  Utilizzare 10 mM di Tris Cl, pH 7,5, non acqua, per diluire il campione prima di misurare la purezza.

### Contaminazione del DNA in esperimenti a valle

- a) Materiale di partenza in eccesso Per alcuni tipi di tessuto l'efficienza della rimozione del DNA può essere ridotta durante il trattamento di quantità molto elevate. Se l'RNA eluito contiene una notevole contaminazione del DNA, provare a trattare meno sezioni di tessuto per preparazione
- b) Tessuto con elevato contenuto di DNA Durante la lavorazione di quantità molto grandi di tessuti ricchi di DNA (p. es., timo), il DNA può non essere completamente digerito. Ripetere la procedura di purificazione utilizzando meno sezioni di tessuto.  
Controllare se la DNasi I è stata conservata correttamente come descritto in "Conservazione e manipolazione dei reagenti" e "Preparazione della soluzione madre di DNasi I".
- c) Trascrizione inversa con quantità insufficiente di RNA La maggior parte delle trascrittasi inverse sono destinate all'uso con circa 1 µg di RNA. Se si esegue una trascrizione inversa con quantità molto piccole di RNA, si consiglia di utilizzare una trascrittasi inversa che sia appositamente studiata per una trascrizione inversa altamente sensibile.

### L'RNA non si comporta bene nelle analisi/applicazioni a valle

- a) RNA frammentato o bloccato a causa della trasformazione della formaldeide L'incubazione a 80°C nella procedura RNeasy DSP FFPE è fondamentale per prestazioni ottimali dell'RNA nella trascrizione inversa e in altre applicazioni enzimatiche a valle. Accertarsi che la temperatura di incubazione sia mantenuta a 80°C per l'intero periodo di incubazione di 15 minuti.  
Sebbene l'incubazione a 80°C rimuova alcune delle trasformazioni della formaldeide, l'RNA purificato da sezioni FFPE non è uno stampo ottimale per reazioni enzimatiche. Si consiglia di utilizzare solo primer random o specifici del gene per la sintesi del cDNA. Si consiglia inoltre di contenere il più possibile la lunghezza degli ampliconi per PCR (<500 nucleotidi).
- b) Carryover dell'etanolo Durante il secondo lavaggio con tampone RPE, accertarsi di centrifugare a  $\geq 8.000 \times g$  per 2 minuti a 15–25°C per asciugare la membrana della colonnina spin RNeasy MinElute. Dopo la centrifugazione, rimuovere delicatamente la colonnina dalla provetta da raccolta, impedendo così alla colonnina di entrare in contatto con il flow-through. Collocare quindi la colonnina in una nuova provetta da raccolta e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti.
- c) Carryover (trascinamento) di sale durante l'eluizione dell'RNA Accertarsi che il tampone RPE sia stato ricostituito aggiungendo il volume corretto di etanolo e che il tampone si trovi a temperatura ambiente (15–25°C).
- d) Trascrizione inversa con quantità insufficiente di RNA La maggior parte delle trascrittasi inverse sono destinate all'uso con circa 1 µg di RNA. Se si esegue una trascrizione inversa con quantità molto piccole di RNA, si consiglia di utilizzare una trascrittasi inversa che sia appositamente studiata per una trascrizione inversa altamente sensibile.

---

# Appendice: Note generali per la manipolazione dell'RNA

## Manipolazione dell'RNA

Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Poiché le RNasi sono difficili da inattivare e anche minime quantità sono sufficienti a distruggere l'RNA, non utilizzare materiale in plastica o vetro senza aver prima eliminato le possibili contaminazioni da RNasi. Fare molta attenzione a non introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente privo di RNasi, mentre si lavora con l'RNA adottare le seguenti precauzioni durante il pretrattamento e l'uso di recipienti monouso e riutilizzabili e di soluzioni.

## Manipolazione in genere

Quando si lavora con l'RNA è necessario utilizzare tecniche di asepsi microbiologiche appropriate. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono la fonte più comune di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare i guanti frequentemente e chiudere le provette subito dopo l'uso. Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio mentre si pipettano le aliquote per le applicazioni successive.

Per rimuovere la contaminazione da RNasi da superfici del banco, articoli di plastica riutilizzabili e attrezzature di laboratorio (p. es., pipette e celle elettroforetiche) si consiglia l'utilizzo di RNaseZap® (n° cat. AM9780) di Ambion®. La contaminazione da RNasi può essere rimossa, in alternativa, utilizzando reagenti da laboratorio generici. Per decontaminare gli articoli di plastica, sciacquare con 0,1 M di NaOH, 1 mM di EDTA seguiti da acqua priva di RNasi (vedi "Soluzioni", pag. 25), oppure sciacquare con cloroformio se gli articoli di plastica sono resistenti al cloroformio. Per decontaminare le



---

celle elettroforetiche, pulire con detergente (p. es., 0,5% SDS), sciacquare con acqua priva di RNasi, sciacquare con etanolo (se le celle sono resistenti all'etanolo) e lasciare asciugare.

## Articoli di plastica monouso

Si consiglia l'utilizzo di provette sterili e monouso in polipropilene per l'intera procedura. Queste provette sono generalmente prive di RNasi e non richiedono trattamenti preliminari per inattivare le RNasi.

## Vetreria

La vetreria deve essere trattata prima dell'uso per assicurarsi che sia esente da RNasi. La vetreria usata per lavorare con l'RNA prima dell'uso deve essere lavata con detergente, risciacquata a fondo e tenuta in forno a 240°C per almeno 4 ore (per tutta la notte, se è più comodo). Il solo autoclavaggio non è sufficiente a inattivare del tutto molte RNasi. In alternativa è possibile trattare la vetreria con DEPC (dietilpirocarbonato), come descritto di seguito in "Soluzioni".

## Soluzioni

Le soluzioni (acqua e altre soluzioni) devono essere trattate con DEPC 0,1%. Il DEPC è un inibitore delle RNasi potente, ma non assoluto. Viene comunemente usato in una concentrazione dello 0,1% per inattivare le RNasi su vetreria o plastica da laboratorio o per creare soluzioni e acqua prive di RNasi. Il DEPC inattiva le RNasi mediante modifica covalente. Aggiungere 0,1 ml di DEPC a 100 ml della soluzione da trattare e agitare vigorosamente per dissolvere il DEPC. Incubare la soluzione per 12 ore a 37°C. Sterilizzare in autoclave per 15 minuti per rimuovere qualsiasi traccia di DEPC. Il DEPC reagisce con le ammine primarie e non può essere usato direttamente per trattare i tamponi Tris. Il DEPC è estremamente instabile in presenza di tamponi Tris e si decompone rapidamente in etanolo e CO<sub>2</sub>. Quando si preparano i tamponi Tris, prima trattare l'acqua con DEPC e poi dissolvere il Tris per ottenere il tampone del caso. I residui di purine nell'RNA sono modificati per carbossilazione dal DEPC anche in quantità traccia. L'RNA carbossilato si traduce con bassissima efficienza nei sistemi acellulari. Tuttavia la sua capacità di formare

ibridi DNA:RNA o RNA:RNA non viene compromessa seriamente a meno che non sia stata modificata una frazione cospicua dei residui di purina. Il DEPC residuo deve essere sempre eliminato dalle soluzioni o dai recipienti mediante autoclavaggio o riscaldamento a 100°C per 15 minuti.

**Nota:** i tamponi RNeasy sono garantiti privi di RNasi senza l'impiego del trattamento con DEPC e sono pertanto esenti da contaminazione da DEPC.

## Informazioni per gli ordini

<b>Prodotto</b>	<b>Indice</b>	<b>N° cat.</b>
Kit RNeasy DSP FFPE (50)	50 colonnine RNeasy MinElute Spin, provette di eluizione, provette di lavaggio, provette di lisi, reagenti e tamponi privi di RNasi.	73604

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

---

## Note

---

Note

### **Contratto di licenza limitata per i kit RNeasy DSP FFPE**

L'uso di questo prodotto implica l'accettazione da parte dell'acquirente o dell'utente del prodotto dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo Kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre nessuna garanzia in merito alla violazione di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce nessuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN potrà far valere i divieti di cui al presente Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutti i costi sostenuti a scopo di indagine e delle spese di giudizio, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific o società controllate). I marchi registrati, i marchi di fabbrica, ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non devono essere considerati non protetti dalla legge.

08/2017 HB-2416-001 1106945 © 2012–2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

---

Ordini [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Assistenza tecnica [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | Sito web [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)