




Prestandaegenskaper

RNeasy® DSP FFPE Kit, Version 1

REF 73604

Versionshantering

Detta dokument är prestandaegenskaper för RNeasy DSP FFPE Kit-kit, version 1, R1.

  	Kontrollera om det finns några nya elektroniska märkningsrevisioner på www.qiagen.com/HB-2416 innan testet utförs. Nuvarande revisionsstatus anges av utgivningsdatumet (format: månad/år).
---	---

Allmän introduktion

RNeasy DSP FFPE Kit är avsett för rening av total-RNA från formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad (formalin-fixed, paraffin embedded; FFPE).

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, t.ex. laborietekniker och läkare som är utbildade i molekylärbio-logiska tekniker. Den använder ett optimerat silika-spinnkolonn-baserat protokoll och inkluderar enzymatiskt avlägsnande av kvarblivet DNA.

RNeasy DSP FFPE Kit isolerar RNA-molekyler som är längre än 70 nukleotider, vilket gör det möjligt att använda satsen för att samla in användbara RNA-fragment för tillämpningar som RT-PCR.

Utbyte av renat RNA

Grundfunktionen hos RNeasy DSP FFPE Kit utvärderas med FFPE-prover från 5 olika humanvävnader (bröst, kolon, lunga, melanom cancer och normal hud; 20 prover var).

FFPE-prover visar en hög nivå av vävnadsheterogenitet. Dessutom är vävnadens ytområde mycket varierande hos FFPE-prover, vilket leder till olika kvantiteter utvunnet RNA. Därför bör användaren optimera antalet snitt, snittjocklek och snittytområde för deras prov och alla rutiner som används i deras laboratorium.

Om kitet används tillsammans med en nedströmstillämpning från QIAGEN® bör du konsultera motsvarande bruksanvisning för instruktioner.

Otillräcklig uttorkning av vävnad under beredning av FFPE-vävnad, för mycket paraffin i provet i provröret, användning av mindre ren etanol (ej molekylärbioologisk klass) än rekommenderat eller kvarbliven etanol i provet kan leda till suboptimal extraktion och låt RNA-kvantitet eller försämrade prestanda nedströms.

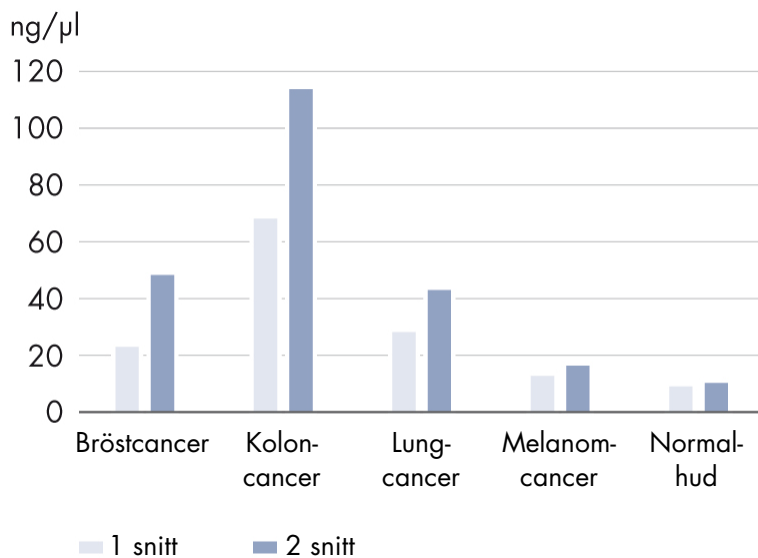


Bild 1. RNA-utbyte från olika humanvävnader (32 µl elueringsvolym).

Nedströmsanalys

Eluerat RNA är bruksfärdigt för olika nedströmsanalyser. För att utvärdera prestandan har 10 ng RNA isolerats med RNeasy FSP FFPE Kit från 5 olika humanvävnader (bröst, kolon, lunga och melanom cancer samt normal hud; 20 prover bestående av ett eller två snitt) och validerats med RT-PCR med humangenet β -actin som mål. Amplifieringen lyckades, vilket visar att RNA som isoleras med RNeasy DSP FFPE Kit kan användas för nedströmsanalys.

Användaren bör optimera antalet snitt, snittjocklek och snittytområde för deras prov och alla rutiner som används i deras laboratorium eller se den specifika prestandan för den relevanta nedströmsanalysen.

	Bröstcancer	Kolon-cancer	Lung-cancer	Melanom-cancer	Normal-hud
RT-PCR 1 snitt	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 snitt	✓	✓	✓	✓	✓

Bild 2. Lyckad RT-PCR-amplifiering av 10 µl FFPE-snitt som härletts för fem olika testade humanvävnader.

Eluatstabilitet

Eluatstabiliteten beror på innehållet och typen av co-renade orenheter (relaterade till vävnadstyp), elueringsvolym och förvaring. Vi rekommenderar att användare utvärderar eluatstabiliteten som behövs för deras specifika krav.

Eluatstabilitet testades för FFPE-härledda human-RNA-prover som förvarades i -15 till -30°C och -60 till -90°C . Ingen försämring observerades på upp till 12 veckor och eluat som förvarades i rumstemperatur ($18-25^{\circ}\text{C}$) var stabila i upp till 12 timmar. Alla tillstånd utvärderas med RT-PCR med humangen β -actin som mål.

Om kitet används tillsammans med en nedströmstillämpning från QIAGEN bör du konsultera motsvarande bruksanvisning för instruktioner.

Repeterbarhet

Repeterbarheten utvärderas med FFPE-prov av nukleerade humanblodceller. Proverna testades med en internt validerad analys för ett 295 bp-fragment av humangen β -actin på en ABI[®]7900 PCR-cykel i realtid.

För statistisk analys användes 108 datapunkter från tre extraktionsbatcher (samma kitparti, operatör och dag). Den statistiska analysen inkluderade beräkning av standardavvikelse och variationskoefficient för C_T -värden som härleds från β -actin RT-PCR. Standardavvikelsen var 1,1 C_T och variationskoefficienten var 4,1 (tabell 1).

Tabell 1. Repeterbarhetsresultat

Repeterbarhet			
	Genomsnittlig C _T	SD	CV (%)
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

Reproducerbarhet

Reproducerbarheten utfördes genom att utvärdera RNA-insamling från FFPE-prover av nukleerade humanblodceller med olika operatörer, på olika dagar och med olika operatörer och dagar. Proverna testades med en internt validerad analys för ett 295 bp-fragment av humangenens β -actin på en ABI 7900 PCR-cykel i realtid. För statistisk analys användes 108 datapunkter från tre extraktionsbatcher. Den statistiska analysen inkluderade beräkning av standardavvikelse och variationskoefficient för C_T-värden som härleds från β -actin RT-PCR (tabell 2).

Tabell 2. Reproducerbarhetsresultat

Reproducerbarhet			
	Genomsnittlig C _T	SD	CV (%)
Olika operatörer	26,92	1,06	3,95
Olika dagar	26,56	1,20	4,53
Olika operatörer och dagar	26,63	1,01	3,78

Linjäritet

RNeasy DSP FFPE Kit kan användas för att isolera RNA från olika FFPE-vävnadsstyper. Systemet har validerats för användning av 1-4 snitt från FFPE-nukleerade humanblodceller och visar en linjär ökning av RNA-utbyte. Ett linjärt område bör fastställas enligt kundens krav och valideras för den specifika användningen. Olika linjära intervall förväntas för olika vävnadsstyper, beroende på vävnadsbelastningen i systemet och vävnadens egenskaper och nedströmsanalyser.

Interfererande substanser

Potentiellt interfererande substanser kan härstamma från olika källor, till exempel naturliga metaboliter som är specifika för vävnad- eller organtypen, metaboliter som producerats under patologiska tillstånd, ämnen som införts under patientbehandling eller ämnen som har förtärs av

patienten. På grund av komplexiteten hos potentiellt interfererande substanser och olika känslighet hos specifika nedströmstillämpningar rekommenderar vi att användare bedömer effekten på interfererande substanser för sina egna system och validerar en metod för att kontrollera interferens i deras specifika diagnostiska nedströmstillämpning.

Interfererande substanser som härleds från komponenter i RNeasy DSP FFPE Kit vid provbearbetning och RNA-extraktion har inte observerats.

För mer information om interfererande substanser i specifika QIAGEN-nedströmsapplikationer, se kitets bruksanvisningar.

Korskontaminering

För att utvärdera nivån av korskontaminering tillsattes 500 ng total-RNA från blod i paraffinborttagande lösning och isolerades intill provrör som inte innehöll RNA (extraktionsnegativa rör). Syftet med studien var att efterlikna situationer där prover med höga nivåer av RNA-målmolekyler kan korskontaminera andra prover vid extraktion. RNA-reningen genomfördes med ett parti reagenser. Korskontaminering utvärderades med PT-PCR med humangenens β -actin som mål. Resultaten visade ingen korskontaminering i systemet.

Uppdaterad licensinformation och produktspecifika friskrivningsklausuler finns i respektive QIAGEN-kithandbok eller -bruksanvisning. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Beställning www.qiagen.com/contact | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com