

2017. augusztus

# RNeasy<sup>®</sup> DSP FFPE Kit használati útmutató (kézikönyv)



50

1. verzió  
In vitro diagnosztikai használatra



In vitro diagnosztikai használatra



73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Németország



R1

1106945HU

# Tartalom

Alkalmazási terület .....	3
Összefoglalás és magyarázat .....	3
Az eljárás elve .....	4
Szállított anyagok .....	6
<b>A kit tartalma .....</b>	<b>6</b>
Szükséges, de nem biztosított anyagok .....	7
Figyelmeztetések és óvintézkedések .....	8
A reagensek tárolása és kezelése .....	10
<b>Kitösszetevők .....</b>	<b>10</b>
Fontos megjegyzések .....	11
A pufferek elkészítése .....	12
Eljárás .....	13
<b>Protokoll: Teljes RNS tisztítása FFPE szöveti mintákból .....</b>	<b>14</b>
Minőség-ellenőrzés .....	18
Korlátozások .....	18
Szimbólumok .....	19
Hibaelhárítási útmutató .....	21
Függelék: Általános megjegyzések az RNS kezeléséről .....	23
<b>Rendelési információk .....</b>	<b>25</b>

---

# Alkalmazási terület

Az RNeasy DSP FFPE Kit formalinban fixált, paraffinba ágyazott (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) szövetekből történő teljes RNS-tisztításra szolgáló rendszer.

A termék csak a molekuláris biológiai technikák területén járatos, szakképzett szakemberek, pl. labortechnikusok és orvosok általi használatra készült.

Az optimalizált protokoll szilikaoszlopot tartalmazó centrifugacső használatán alapszik és a hátramaradó DNS-t enzimatikus emésztés segítségével távolítja el.

Az RNeasy DSP FFPE Kit in vitro diagnosztikai használatra szolgál.

## Összefoglalás és magyarázat

Az RNeasy DSP FFPE Kit specifikusan formalinban fixált, paraffinba ágyazott (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) szöveti metszetekből történő teljes RNS-tisztításra szolgáló rendszer. A 70 nukleotidnál hosszabb RNS-molekulák izolálása révén a kit által izolált RNS-fragmentumok olyan módszerekhez is felhasználhatóak, mint az RT-PCR.

Az FFPE mintákban található nukleinsav-molekulákat a fixálás és a beágyazás természetéből adódóan a formaldehid általában fragmentálja és kémiai módon módosítja. Emiatt a friss vagy a fagyasztott mintákhoz képest az FFPE mintákból származó nukleinsav-izolátumok gyakran alacsonyabb molekulásúak. A fragmentálódás mértéke függ a minta típusától, korától, a fixálás, a beágyazás, illetve a tárolás körülményeitől. Az FFPE szövetminták előzetes vizsgálatát a CEN/TS 16827-1:2015-ös számú standard szerint javasoljuk.

---

Noha a formaldehid által okozott módosítások a standard minőségvizsgáló assayk (pl. gélelektroforézis, lab-on-a-chip) segítségével nem mutathatók ki, az enzimatikus vizsgálatokat erősen zavarják.

Habár az RNeasy DSP FFPE Kit úgy lett optimalizálva, hogy a formaldehid okozta módosításokat, amennyire lehetséges, visszafordítsa és az RNS további degradálódását megelőzze, az FFPE mintákból származó nukleinsavakat ne használjuk olyan vizsgálati módszerekhez, amelyekhez intakt RNS szükséges. A fragmentálódott RNS használatához egyes vizsgálati módszerek módosítására lehet szükség (pl. RT-PCR esetén rövid ampliconok tervezése). A cDNS szintéziséhez oligo-dT primerek helyett random primerek vagy génspecifikus primerek használata szükséges.

Az FFPE minták festése az RNS minőségét és a további vizsgálatok eredményeit továbbronthatja. Az immunhisztokémiai festésekre ez különösen igaz.

## Az eljárás elve

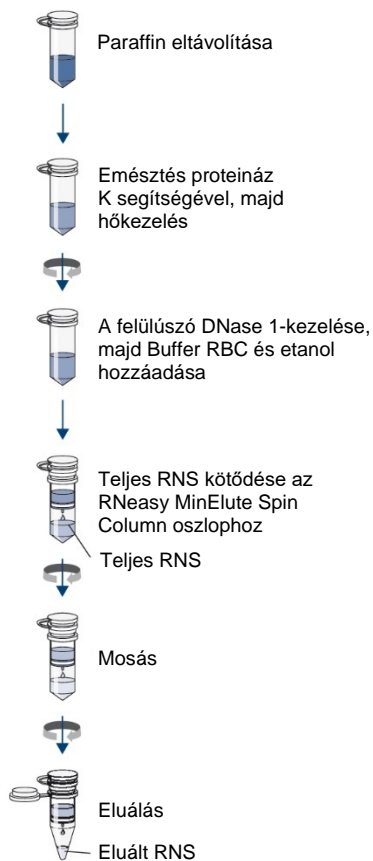
Az RNeasy DSP FFPE eljárás az RNS tisztítására a jól kidolgozott RNeasy technológiát használja. A specifikusan optimalizált lizálási körülményeknek köszönhetően a teljes RNS az FFPE szöveti metszetekből hatékonyan tisztítható. A DNáz I emésztési lépés hatékonyan távolítja el a DNS-szennyeződést, ideértve az erősen töredezett molekulákat is.

A Deparaffinization Solution segítségével történő kezelés a frissen metszett FFPE szöveti metszetekből az összes paraffint eltávolítja. A mintákat ezután optimalizált lízispufferben inkubáljuk, amely proteináz K tartalma révén a metszetekből felszabadítja az RNS-t. A magasabb hőmérsékleten történő rövid inkubálás a felszabadított nukleinsav láncok közötti, formalin okozta keresztkötéseket részlegesen eltávolítja, ami az RNS-hozamot, annak minőségét, illetve a későbbi vizsgálati enzimatikus vizsgálati módszerek teljesítményét fokozza. Ezután DNáz I-kezelés következik, amely a genomiális DNS, illetve a formalinban hosszasan fixált mintákban és a régi mintákban gyakran előforduló nagyon rövid DNS-fragmentumok eltávolítására szolgál.

Az emésztést követően a lizátumot Buffer RBC pufferrel keverjük össze. Az etanol hozzáadása az RNS számára megfelelő kötődési körülményeket biztosít. Ezt követően a mintát az RNeasy MinElute Spin Column oszlopra pipettázzuk, amelyben a teljes RNS a membránhoz köt és amelyről a szennyező anyagok hatékonyan lemoshatóak. Az RNS-t ezután legalább 14 µl RNáz-mentes vízzel eluáljuk.

### RNeasy DSP FFPE eljárás

FFPE szöveti metszetek



1. ábra: RNS-tisztítási eljárás FFPE szövetmintákból az RNeasy DSP FFPE Kit segítségével.

# Szállított anyagok

## A kit tartalma

<b>RNeasy DSP FFPE Kit</b>		<b>(50)</b>	
<b>Katalógusszám</b>		<b>73604</b>	
<b>Készítmények száma</b>		<b>50</b>	
	Megnevezés	Szimbólumok	Mennyiség
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (RNeasy MinElute® Spin Column oszlopok) (rózsaszín) (2 ml-es mosócsövekkel)	<b>COL</b>	50
ET	Elution Tubes (Elúciós csövek) (1,5 ml)	<b>ELU TUBE</b>	50
LT	Lysis Tubes (Líziscsövek) (2 ml)	<b>LYS TUBE</b>	150
WT	Wash Tubes (Mosócsövek) (2 ml)	<b>WASH TUBE</b>	250
DPS	Deparaffinization Solution (Deparaffináló oldat)	<b>DEPAR SOL</b>	20 ml
RBC	Buffer RBC (RBC puffer)*	<b>BIND BUF</b>	45 ml
PKD	Buffer PKD (PKD puffer)	<b>PROTK DIL</b>	15 ml
PK	Proteinase K (Proteináz K)	<b>PROTK</b>	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (RNáz-mentes DNáz I) (liofilizált)	<b>DNase</b>	1
RNFW	RNase-Free Water (RNáz-mentes víz)	<b>ELU DIL</b>	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer (DNáz hígító puffer)	<b>DNase BUF</b>	2 ml
RPE	Buffer RPE (RPE puffer) <sup>†</sup> (koncentrátum)	<b>WASH BUF CONC</b>	11 ml
HB, v1	RNeasy DSP FFPE Kit kézikönyv		1

\*Guanidinsót tartalmaz. Hipót tartalmazó fertőtlenítőkzerekkel együtt nem használható. A biztonsági információkat lásd a 8. oldalon.

<sup>†</sup>A munkaidőt előállításához az első használat előtt a 12. oldalon leírtaknak megfelelően adjon hozzá 4 térfogatnyi (96–100%-os, nem denaturált) etanol a palackon feltüntetettek szerint.

---

# Szükséges, de nem biztosított anyagok

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információk a megfelelő biztonsági adatlapokon (Safety Data Sheets, SDS-ek) találhatóak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Győződjön meg róla, hogy az eszközöket a gyártó ajánlásai szerint ellenőrizték és kalibrálták.


- Steril, RNáz-mentes pipettahegyek és pipetták
- Mikrocentrifuga (rotorral, 2 ml-es csövekhez)
- Vortex keverő
- 100% etanol (ne használjon denaturált alkoholt; a denaturált alkohol más anyagokat, például metanolt vagy metil-etil-ketont is tartalmaz)
- Egyszer használatos kesztyűk
- 56–80 °C közötti inkubációra alkalmas keverőfunkciós fűtőblokk

# Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai használatra.

A kit használata előtt figyelmesen olvassa el az összes utasítást.

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (Safety Data Sheets, SDS-ek) tartalmazzák. Ezek PDF-formátumban elérhetők online a **[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)** címen, ahol megtalálhatja, megtekintheti és kinyomtathatja a minden egyes QIAGEN kithoz és annak komponenseihez tartozó SDS biztonsági adatlapokat.

<b>VIGYÁZAT</b>	Személyi sérülés kockázata
	SOHA NE adjon fehérítőszeret vagy savat tartalmazó oldatot közvetlenül a mintaelőkészítés hulladékához.

Az RNeasy DSP FFPE Kit pufferei nátrium-azidot tartalmaznak. Ha a kit valamely puffere kiömlik, megfelelő laboratóriumi tisztítószer és víz segítségével takarítsa fel. Ha potenciálisan fertőző ágenszt tartalmazó folyadék ömlik ki, az érintett felületet először laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel, majd 1%-os (v/v) nátrium-hipoklorittal tisztítsa meg.

Az RNeasy DSP FFPE Kit komponenseire a következő figyelmeztető és óvintézkedésre vonatkozó mondatok érvényesek.

PKD, RPE, RNF, DBB

**Tartalmazott anyag:** Nátrium-azid. Vigyázat! Lenyelve ártalmas lehet. Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz.



#### DSP



Hexadekánt tartalmaz. Veszély! Lenyelve vagy a légutakba kerülve halálos lehet. Az ismételt kitettség bőrszárazságot vagy a bőr berepedezését okozhatja. A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékkezelő létesítményben. TILOS a hánytatás! LENYELES ESETÉN: Azonnal forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. Elzárva tárolandó.

#### Proteináz K



Tartalmazott anyag: Proteinase K. Vigyázat! Enyhén bőrirritáló hatású. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékkezelő létesítményben. Légzési problémák esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. BELÉLEGZÉS ESETÉN: Légzési nehézségek esetén az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Légzésvédelem használata kötelező.

#### DNáz I



Tartalmazott anyag: Deoxiribonukleáz. Veszély! Allergiás bőrreakciót válthat ki. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékkezelő létesítményben. Légzési problémák esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. BELÉLEGZÉS ESETÉN: Légzési nehézségek esetén az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező. Légzésvédelem használata kötelező.

#### RBC



Guanidin-hidrokloridot tartalmaz. Vigyázat! Lenyelve vagy belélegezve ártalmas. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. A tartalom/edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékkezelő létesítményben. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

#### DBB



Kalcium-kloridot és hidrogén-kloridot tartalmaz. Vigyázat! Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Ha a szemirritáció nem múlik el: Orvosi ellátást kell kérni. HA SZEMBE KERÜL: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. HA BÖRRE KERÜL: Bőséges szappanos vízzel mossa le. Bőrirritáció esetén: Orvosi ellátást kell kérni. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

---

# A reagensek tárolása és kezelése

Az RNáz-mentes DNáz I-et és az RNeasy MinElute Spin Column oszlopokat az átvételüket követően azonnal 2–8 °C-on kell tárolni. A pufferek szobahőmérsékleten (15–25 °C) tárolhatók. Ezen feltételek mellett a kit a doboz címkéjén feltüntetett lejárat dátumig a teljesítőképesség romlása nélkül tárolható.

Az RNeasy DSP FFPE Kitet lejárat után ne használja.

## Kitösszetevők

Az egyes reagensek lejárat dátuma az adott összetevő címkéjén található. Helyes tárolási körülmények mellett a termék a stabilitási időn belül megőrzi teljesítményét, feltéve, hogy azonos gyártási tételbe tartozó összetevőket használnak.

A DNáz I visszaoldás utáni hosszú távú tárolásához a törzsoldatot pipettázza szét egyszer használatos alikvotokra, amelyek így –15 és –30 °C között legfeljebb 9 hónapig tárolhatók. A felolvasztott alikvotok 2–8 °C-on legfeljebb 6 hétig tárolhatók. Felolvasztás után az alikvotokat ne fagyassza vissza.

A reagenseket ne tegye ki UV-fénynek (például dekontaminálás céljából), mivel ez a reagensek öregedésének felgyorsulását okozhatja.

# Fontos megjegyzések

## Kiindulási anyag

A standard formalinos fixálási és paraffinba ágyazási eljárások minden esetben a nukleinsavak jelentős mértékű fragmentálódását és keresztkötődését eredményezik. A nukleinsav-fragmentáció és -keresztkötődés mértékének visszaszorítása érdekében mindenképp kövesse az alábbiakat:

- Legfeljebb 5 mm vastag mintát használjon, hogy a formalin könnyen és teljes mértékben átjárhassa
- A műtéti eltávolítást követően a lehető leggyorsabban fixálja a szövetmintákat 4–10%-os semleges pufferelt formalinban
- A fixálás ideje legfeljebb 24 óra legyen (a hosszabb fixálási idő nagyobb mértékű nukleinsav-fragmentációhoz vezet, ami a későbbi vizsgálatok eredményességét rontja)
- A beágyazás előtt a mintát alaposan dehidratálja
- A beágyazáshoz használjon alacsony olvadáspontú paraffint

Az RNS-tisztítás kiinduló anyagának frissen metszett FFPE szöveti metszetnek kell lennie, amelynek vastagsága legfeljebb 20 µm. Az ennél vastagabb metszet használatával a nukleinsav-hozam hatékonysága még megnövelt időtartamú proteináz K-emésztés mellett is csökkenhet. Mintánként akár 4, darabonként legfeljebb 10 µm vastagságú metszetet is összevonhatunk. Amennyiben a metszetek összesített vastagsága nem haladja meg a 40 µm-t, mintánként 4-nél több metszetet is összevonhatunk (pl. nyolc darab 5 µm vastagságú metszetet).

A tisztított RNS DNS-szennyeződését elkerülendő, különösen magas DNS-tartalmú szövetek esetén mintánként kevesebb metszet használata javasolt.

Ha a kiindulási anyaggal kapcsolatban ilyen jellegű információval nem rendelkezik, mintánként legfeljebb 2 metszet használatát javasoljuk. Az RNS-hozamtól és -tisztaságtól függően az ezt követő preparátumokban akár 4 metszet is használható. Az RNeasy MinElute Spin Column túltelítése az RNS-hozamot és -tisztaságot mindenesetre szignifikáns mértékben csökkentheti.

# A pufferek elkészítése

## A DNáz I törzsoldat elkészítése

A DNáz I törzsoldat elkészítéséhez a liofilizált DNáz I-et oldja fel 550 µl RNáz-mentes vízben. A veszteség elkerülése érdekében a DNáz I-et tartalmazó üveget ne nyissa ki. Az RNáz-mentes vizet RNáz-mentes injekciós tű és fecskendő segítségével injektálja az üvegbe. Az üveg megfordításával óvatosan keverje össze az oldatot. Ne vortexelje.

Egyes esetekben a DNáz I-et tartalmazó üveg üresnek tűnhet. Ez azért lehetséges, mert a liofilizált enzim a gumidugóra ragadhat. A veszteség elkerülése érdekében a DNáz I-et tartalmazó üveget ne nyissa ki. A DNáz I-et az alább leírtak szerint injekciós tű és fecskendő segítségével oldja fel.

**Megjegyzés:** A DNáz I a fizikai denaturációra különösen érzékeny. A keverést kizárólag az üveg óvatos megfordításával végezze.

**Megjegyzés:** A kimért RNáz-mentes víz teljes térfogatát injektálja az üvegbe.

A DNáz I feloldása után előfordulhat, hogy a liofilizált DNáz I oldatban feloldatlan anyag marad, ami a gyártási folyamatból fakadó normális jelenség és a DNáz I eredményességét nem befolyásolja.

A DNáz I hosszú távú tárolásához a törzsoldatot pipettázza szét egyszer használatos alikvotokra, amelyek így  $-15$  és  $-30$  °C között legfeljebb 9 hónapig tárolhatók. A felolvasztott alikvotok  $2-8$  °C-on legfeljebb 6 hétig tárolhatók. Felolvasztás után az alikvotokat ne fagyassza vissza.

## A Buffer RPE elkészítése

A 11 ml Buffer RPE puffert tartalmazó palackhoz adjon 4 térfogatnyi (44 ml) 96–100%-os alkoholt. A palack címkéjén lévő négyzetet pipálja ki, ezzel jelezve, hogy az etanol hozzáadása megtörtént.

**Megjegyzés:** Az eljárás megkezdése előtt az elkészített Buffer RPE palackját rázás segítségével keverje fel.

# Eljárás

## A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- Ha először használja az RNeasy DSP FFPE Kitet, olvassa el a „Fontos megjegyzések” részt (11. oldal)
- Ha először dolgozik RNS-sel, olvassa el a „Függelék: Általános megjegyzések az RNS kezeléséről” részt (23. oldal).
- A Buffer RBC guanidinsót tartalmaz, ezért a hipót tartalmazó fertőtlenítőszerrel nem használható. A biztonsági információkat lásd a 8. oldalon.
- Ha az útmutató másként nem rendelkezik, az eljárás minden lépése szobahőmérsékleten (15–25 °C) végzendő. Az eljárás folyamán gyorsan, szünetek nélkül dolgozzon.
- Minden centrifugálási lépést szobahőmérsékletű (15–25 °C) mikrocentrifuga segítségével végezzen. Hűtött mikrocentrifuga használatakor a hőmérsékletet állítsa 20–25 °C közé, máskülönben előfordulhat, hogy az eszköz 15 °C alá hűl.
- Az alábbi eljárás során a használandó térfogatokat ▲ jelöli, ha mintánként 1-2 metszetet használ, míg a használandó térfogatokat ● jelöli, ha mintánként >3-4 metszetet használ.
- A legelső használat előtt a Buffer RPE puffert és RNáz-mentes DNáz I-et a „A pufferek elkészítése” részben leírtak szerint elő kell készíteni (12. oldal).
- Hagyjon minden puffert szobahőmérsékletűre (15–25 °C) jönni. Az elkészített Buffer RPE puffert rázás segítségével keverje fel.
- Az 5. és 9. lépéshez a fűthető rázó inkubátort állítsa 56 °C-ra. A várakozási idő csökkentése céljából a 9. lépéshez állítson egy másik fűthető rázó inkubátort 80 °C-ra.
- **Megjegyzés:** A tisztítási eljárás során ne álljon meg, mert a megnövekedett inkubációs idők alkalmazása az RNS degradálódásához, illetve elvesztéséhez vezethet. Legfeljebb 12 párhuzamos minta esetén az eljárás átlagos időtartama körülbelül 130 perc.

## Protokoll: Teljes RNS tisztítása FFPE szöveti mintákból

1. Szike segítségével vágj le a mintablokkról a felesleges paraffint.
2. Készítsen 5–20 µm vastagságú metszeteket.  
Ha a minta felszíne levegővel érintkezett, az első 2-3 metszetet dobja ki.
3. A metszeteket azonnal helyezze ▲ 1,5 ml-es, illetve ● 2 ml-es mikrocentrifuga-csőbe és zárja le a kupakot.
4. Adjon hozzá ▲ 160 µl, illetve ● 320 µl Deparaffinization Solution oldatot, és vortex keverővel erőteljesen keverje 10 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja, hogy a minta a cső alján helyezkedjen el.
5. Inkubálja a mintát 56 °C-on 3 percig, majd 5 percig hagyja, hogy szobahőmérsékletre hűljön.

Ha túl kevés Deparaffinization Solution oldatot használt, vagy túl sok paraffin volt a mintánkban, a deparaffináló oldat lehűlés után viaszossá, szilárddá válhat. Ha ez megtörténik, 160 µl-enként adjon további Deparaffinization Solution oldatot a mintánkhoz és ismételje meg az 5. lépést.

6. Adjon hozzá ▲ 150 µl, illetve ● 240 µl Buffer PKD puffert, majd vortex keverővel 3 másodpercig keverje.
7. Centrifugálja 1 percig 11 000 x g-vel.
8. Az alsó, átlátszó fázishoz adjon 10 µl proteináz K-t és 10 fel-le pipettázás segítségével óvatosan keverje el (a különvált fázisokat ne keverje össze).
9. Inkubálja 56 °C-on 15 percig 1100 rpm mellett, majd 80 °C-on 15 percig 1100 rpm mellett.  
Egyetlen fűtőblokk használatakor az 56 °C-on végzett inkubálást követően hagyja a mintát szobahőmérsékleten, amíg a fűtőblokk hőmérséklete el nem éri a 80 °C-ot.

**Megjegyzés:** A maximális RNS-hozam eléréséhez a szövet proteináz K-val történő teljes emésztése nem szükséges, azonban a 80 °C-os inkubációs lépés kritikus fontosságú.

**FONTOS:** A 15 perces inkubálás megkezdése előtt győződjön meg róla, hogy a fűtőblokk hőmérséklete elérte a 80 °C-ot. A 15 perces, 80 °C-os inkubációs lépés kritikus fontosságú a formaldehid okozta keresztkötések megszüntetéséhez és az RNS optimális teljesítményének eléréséhez pl. real time RT-PCR reakciók során.

10. Rövid ideig centrifugálja, majd az alsó, szintelen fázisból pipettázzon ▲ 145 µl-t, illetve ● 230 µl-t egy új 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csőbe.
11. Inkubálja jégen 3 percig. Ezután centrifugálja 15 percig 20 000 x g-vel.
12. A felülúszót pipettázza át egy 2 ml-es mikrocentrifuga-csőbe ügyelve, hogy a pelletből ne kerüljön a pipettába.  
A pellet oldhatatlan sejtörmeléket pl. keresztkötött DNS-t tartalmaz.
13. Adjon hozzá a teljes mintatérfogot egytizedének megfelelő térfogatú DNáz hígító puffert (▲ 14,5 µl, illetve ● 23 µl) és 10 µl DNáz I törzsoldatot. A keverést a cső megfordításával végezze. Rövid ideig centrifugálja, hogy a cső oldalára tapadt folyadék a cső aljára jusson.  
**Megjegyzés:** A DNase I-et a kit liofilizált formában tartalmazza és a „A DNáz I törzsoldat elkészítése” részben leírtaknak megfelelően kell feloldani (12. oldal).  
**Megjegyzés:** A DNase I a denaturációra különösen érzékeny. A keverést kizárólag a cső finom megfordításával végezze. Ne vortexelje.
14. Inkubálja szobahőmérsékleten 15 percig.
15. A kötési feltételek biztosítása céljából adjon hozzá ▲ 320 µl, illetve ● 500 µl Buffer RBC puffert és vortex keverővel alaposan keverje 3 másodpercig, majd rövid ideig centrifugálja.
16. Adjon ▲ 720 µl, illetve ● 1200 µl 100%-os etanolt a mintához. Ne centrifugálja. Folytassa közvetlenül a 17. lépéssel.  
Az etanol hozzáadása után szemmel látható csapadék képződhet. Ez nem befolyásolja az eljárást.
17. 5 fel-le pipettázás segítségével alaposan keverje össze a mintát, majd (az esetlegesen formálódott csapadékot beleértve) 700 µl-t mérjen át egy 2 ml-es mosócsőbe helyezett RNeasy MinElute Spin Column oszlopra. A kupakot óvatosan zárja le, majd centrifugálja 15 másodpercig ≥8000 x g fordulaton. Dobja ki az átfolyt frakciót\* tartalmazó mosócsövet és az oszlopot helyezze egy új mosócsőbe (a kit tartalmazza).

\* Az átfolyt frakció Buffer RBC puffert tartalmaz, ezért hipóval nem keverhető. A biztonsági információkat lásd a 8. oldalon.

18. Ismétlje meg a 17. lépést (további keverés nélkül), amíg a teljes minta át nem folyt az RNeasy MinElute Spin Column oszlopon.

19. Pipetázzon 500 µl Buffer RPE puffert az RNeasy MinElute Spin Column oszlopra. A kupakot óvatosan zárja le, majd centrifugálja 15 másodpercig  $\geq 8000 \times g$  fordulaton. Dobja ki az átfolyt frakciót\* tartalmazó mosócsövet és az oszlopot helyezze egy új mosócsőbe (a kit tartalmazza).

**Megjegyzés:** A Buffer RPE puffert a kit koncentrált formában tartalmazza. Gondoskodjon róla, hogy használat előtt az etanol hozzáadása megtörtént „A Buffer RPE elkészítése” részben leírtaknak megfelelően.

20. Pipetázzon 500 µl Buffer RPE puffert az RNeasy MinElute Spin Column oszlopra. A kupakot óvatosan zárja le, majd centrifugálja 2 percig  $\geq 8000 \times g$  fordulaton, hogy az oszlop membránja átmosódjon. Dobja ki az átfolyt frakciót\* tartalmazó mosócsövet és az oszlopot helyezze egy új mosócsőbe (a kit tartalmazza).

**Megjegyzés:** Centrifugálás után óvatosan emelje ki az RNeasy MinElute Spin Column oszlopot a mosócsőből úgy, hogy az oszlop nem ér az átfolyt frakcióhoz. Máskülönb en etanol-átszennyezés fordulhat elő.

21. A spin oszlop kupakját nyissa ki és centrifugálja maximális sebességgel 5 percig. Dobja ki az átfolyó frakciót tartalmazó mosócsövet.

A kupakok sérülésének megelőzése érdekében a spin oszlopokat úgy helyezze be a rotorba, hogy közöttük legalább egy pozíciót üresen hagy. A kupakokat a rotor forgásával ellentétes irányba állítsa be (pl. ha a rotor az óramutató járásával megegyező irányban forog, a kupakokat az óramutató járásával ellentétes irányba állítsa).

Fontos, hogy a spin oszlop membránja megszáradjon, mert a hátramaradó etanol a további reakciókat zavarhatja. A nyitott kupakkal történő centrifugálás biztosítja, hogy az RNS eluálása közben nem történik etanol-átszennyeződés.

\* Az átfolyt frakció Buffer RBC puffert tartalmaz, ezért hipóval nem keverhető. A biztonsági információkat lásd a 8. oldalon.



---

22. Helyezze az RNeasy MinElute Spin Column oszlopot egy új 1,5 ml-es elúciós csőbe (a kit tartalmazza). Mérjen 14–32 µl RNáz-mentes vizet közvetlenül a spin oszlop membránjának a közepére. Óvatosan zárja le a kupakot és centrifugálja maximális sebességgel 1 percig, hogy az RNS-t eluálja.

A kisebb térfogatnyi RNáz-mentes vízzel történő eluálás magasabb RNS-koncentrációt, de alacsonyabb RNS-hozamot eredményez.

**Megjegyzés:** Várhatóan alacsony RNS-hozamok esetén az eluáláshoz alacsony kötőerejű tesztcső (a kit nem tartalmazza) használata ajánlott. Az RNeasy MinElute Spin Column átlagos holttérfogata 2 µl: 14 µl RNáz-mentes vízzel történő eluálás körülbelül 12 µl eluátumot eredményez.

23. Az RNS-eluátumok  $-60$  és  $-90$  °C, illetve  $-15$  és  $-30$  °C között legfeljebb 8 hétig tárolhatók.

---

# Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően a RNeasy DSP FFPE Kitek minden egyes gyártási tétele esetében ellenőrizzük az előre meghatározott specifikációknak való megfelelést, ezzel biztosítva a termék egyenletes és kifogástalan minőségét.

## Korlátozások

A rendszer teljesítményének meghatározását célzó vizsgálatok során formalinban fixált, paraffinba ágyazott mintákból származó tisztított humán RNS-t használtunk.

A felhasználó felelőssége, hogy validálja a rendszer teljesítményét a laboratóriumában alkalmazott bármely olyan eljárásra, amely a QIAGEN teljesítmény-kiértékelő vizsgálatoknak nem része.

A diagnosztikai eredményeket negatívan befolyásoló hatások kockázatának minimalizálása érdekében a további alkalmazásokhoz megfelelő kontrollokat kell használni.

A kapott diagnosztikai eredményeket mindig az egyéb klinikai vagy laboratóriumi leletekkel összefüggésben kell értelmezni.

# Szimbólumok

Jelen használati útmutatóban az alábbi táblázatban felsorolt szimbólumokat alkalmaztuk.



<N>

<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz



Lejárati dátum



In vitro diagnosztikai alkalmazásra szolgáló  
orvostechnikai eszköz



Az áru beérkezését követően



DN



RNeasy MinElute Spin



Katalógusszám



Tételszám



Anyagszám (azaz az összetevők címkéje)



Összetevők (azaz a tartalom listája)

**CONT**

Tartalmazott anyag (tartalom)

**NUM**

Szám (azaz üvegek, palackok)

**GTIN**

Globális kereskedelmi áruazonosító szám  
(Global Trade Item Number, GTIN)

Rn

Az R a Használati útmutató (Kézikönyv) módosítását,  
az n pedig a módosítás számát jelöli



Hőmérsékleti határértékek



Gyártó



Lásd a használati útmutatót



Figyelem!

**PROTK**

Proteináz K

Sodium azide

Nátrium-azid

# Hibaelhárítási útmutató

Ez a hibaelhárítási útmutató bármely felmerülő hiba esetén segíthet a megoldásban. További információkért kérjük, olvassa el műszaki támogatási oldalunkon a gyakran ismételt kérdéseket: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). A QIAGEN műszaki ügyfélszolgálat kutató szakemberei örömmel állnak rendelkezésére, ha bármilyen kérdése van akár ennek a kézikönyvnek a tartalmával és/vagy a benne szereplő protokollokkal kapcsolatban, akár a mintafeldolgozási és vizsgálati módszerekkel kapcsolatban (az elérhetőség a következő címen található: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Megjegyzések és javaslatok

### Eldugult RNeasy MinElute Spin Column

- |  |  |
|--|--|
| a) Túl sok kiindulási anyag                  | Csökkentse a kiindulási anyag mennyiségét. A megfelelő mennyiségű kiindulási anyag használata alapvető fontosságú (lásd 11. oldal).  |
| b) A centrifugálási hőmérséklet túl alacsony | A centrifugálási hőmérsékletnek 15–25 °C kell lennie. Némely centrifuga még akkor is 15 °C alá hűt, ha 20 °C-ra van állítva. Ez csapadékképződéshez vezethet, ami az RNeasy MinElute Spin Column oszlopot eltömítheti. Ha ez megtörténik, állítsa a centrifuga hőmérsékletét 25 °C-ra. |

### Alacsony RNS-hozam

- |   |  |
|---|--|
| a) Rossz minőségű kiindulási anyag                                | Az olyan minták, amelyeket több, mint 24 órán keresztül fixáltak, illetve nagyon hosszú időn keresztül tároltak, nagyon kis mennyiségű használható RNS-t tartalmazhatnak.<br>A tárgylemezre rögzített metszetekből a hosszú ideig tartó levegőnek való kitettség miatt előfordulhat, hogy az RNS-hozam alacsonyabb lesz. |
| b) Túl sok kiindulási anyag                                       | Az RNeasy MinElute Spin Column túltelítése a nukleinsav-hozamot szignifikáns mértékben csökkenti. Csökkentse a kiindulási anyag mennyiségét (lásd 11. oldal).  |
| c) Az RNS az RNeasy MinElute Spin Column membránjához kötve marad | Ismételje meg az RNS-elúciós lépést, de az RNáz-mentes víz hozzáadása után és a centrifugálás előtt az RNeasy MinElute Spin Column oszlopot 10 percig inkubálja a munkaasztalon.   |
| d) A pufferek/reagensek rossz tárolása                            | Az RNeasy MinElute Spin Column oszlopokat és a DNáz I-et is a kit kézhezvétele után azonnal 2–8 °C között kell tárolni. Ellenőrizze, hogy a tárolási hőmérséklet megfelelő-e, mert a huzamosabb időn át tartó magasabb hőmérsékleten való tárolás funkcióvesztést okozhat.   |

## Megjegyzések és javaslatok

### Alacsony $A_{260}/A_{280}$ érték

- a) Vízet használtak az RNS  $A_{260}/A_{280}$  méréshez való hígításához
- A tisztaság mérésekor a minta hígításához víz helyett használjon 10 mM Tris Cl-t, pH 7,5.

### A további kísérletek során DNS-szennyeződés tapasztalható

- a) Túl sok kiindulási anyag
- Némely szövettípus esetén ha túl nagy mennyiségű szövetet dolgoz fel, a DNS eltávolításának hatékonysága csökkenhet. Ha az RNS-elúátum jelentős mennyiségű DNS-t tartalmaz, próbáljon mintánként kevesebb metszetből kiindulni.
- b) Magas DNS-tartalmú szövet
- Ha nagyon nagy mennyiségű DNS-ben gazdag szövetet (pl. csecsemőmirigy) dolgoz fel, előfordulhat, hogy a DNS nem emésztődik meg teljes mértékben. A tisztítási eljárást ismételje meg kevesebb metszetből. Ellenőrizze, hogy a DNáz I megfelelő hőmérsékleten lett tárolva, ahogyan a „Reagensek tárolása és kezelése” és a „A DNáz I törzsoldat készítése” részben olvasható.
- c) Reverz transzkripció elégtelen mennyiségű RNS-ről
- A legtöbb reverz transzkriptáz mellé körülbelül 1 µg RNS használata javasolt. Ha nagyon kis mennyiségű RNS-ről tervez reverz transzkripciót, javasoljuk, hogy használjon olyan reverz transzkriptázt, amelyet specifikusan nagy érzékenységű reverz transzkripcióhoz terveztek.

### A kapott RNS a további vizsgálatok/alkalmazások során rosszul teljesít.

- a) Az RNS töredezett vagy formaldehid-módosítás miatt nem megfelelő szerkezetű
- Az RNeasy DSP FFPE eljárás során a 80 °C-os inkubáció az RNS reverz transzkripció és egyéb további enzimatis reakció során nyújtott megfelelő teljesítményéhez kritikus fontosságú. Győződjön meg róla, hogy a 80 °C-os inkubálási hőmérséklet a 15 perces inkubáció teljes ideje alatt fennáll. Noha a 80 °C-os inkubálás a formaldehid okozta módosítások egy részét visszafordítja, az FFPE metszetekből származó RNS az enzimatis reakciókhoz nem optimális templát. A cDNS-szintézishez kizárólag random primer vagy génspecifikus primerek használatát ajánljuk. Amennyire csak lehet, a PCR során az ampikon hosszát is minél rövidebbre ajánlott tervezni (<500 nukleotid).
- b) Etanol átszennyezés
- Az RNeasy MinElute Spin Column membránjának megszáradásához a Buffer RPE pufferrel történő második mosás során győződjön meg róla, hogy a centrifugálás legalább  $\geq 8000 \times g$  fordulaton, 2 percig, 15–25 °C között történik. Centrifugálás után óvatosan emelje ki az oszlopot a mosócsőből úgy, hogy az oszlop nem ér az átfolyt frakcióhoz. Ezután helyezze az oszlopot egy új mosócsőbe és centrifugálja maximális sebességgel 5 percig.
- c) Só-átszennyezés RNS elúció közben
- Győződjön meg róla, hogy a Buffer RPE előkészítése a megfelelő etanol hozzáadásával történt meg és hogy a puffer szobahőmérsékletű (15–25 °C).
- d) Reverz transzkripció elégtelen mennyiségű RNS-ről
- A legtöbb reverz transzkriptáz mellé körülbelül 1 µg RNS használata javasolt. Ha nagyon kis mennyiségű RNS-ről tervez reverz transzkripciót, javasoljuk, hogy használjon olyan reverz transzkriptázt, amelyet specifikusan nagy érzékenységű reverz transzkripcióhoz terveztek.

# Függelék: Általános megjegyzések az RNS kezeléséről

## Az RNS kezelése

A ribonukleázok (RNázok) nagyon stabil és aktív enzimek, amelyekhez általában nincsen szükség kofaktorokra. Mivel az RNázokat nehéz inaktíválni, és még parányi mennyiségben is képesek lebontani az RNS-t, soha ne használja úgy a műanyag vagy üvegeszközöket, hogy előtte nem távolította el róluk a lehetséges RNáz-szennyeződések. Nagy gondossággal kell eljárni, nehogy véletlenül RNáz-t vigyen be egy RNS mintába a tisztítási eljárás alatt vagy után. Az RNáz-mentes környezet létrehozása és fenntartása érdekében az alábbi óvintézkedések szükségesek az eldobható és többször használható edények és oldatok előkezelése és használata során, amikor RNS-sel dolgozik.

## Általános kezelés

RNS-sel történő munkavégzés során mindig megfelelő mikrobiológiai, aszeptikus technikát kell alkalmazni. A kéz és a porrészeccskék baktériumokat és penészgombákat hordozhatnak, és az RNáz-szennyeződés legáltalánosabb forrásai. A bőrfelületről vagy a poros laboratóriumi eszközökről származó RNáz-szennyeződések átvitelének megakadályozása céljából a reagensek és RNS-minták kezelésekor mindig viseljen latex- vagy vinilkesztyűt. Gyakran váltson kesztyűt, és amikor csak lehetséges, tartsa lezárva a csöveket. Amikor a további alkalmazások számára alikvotokat pipettáz, a tisztított RNS-t tartsa jégen.

A laborasztalokon, nem egyszer használatos műanyag eszközökön és laboratóriumi felszereléseken (pl. pipettákon és elektroforézis-kádakon) előforduló RNáz-szennyeződés eltávolításához használja az Ambion® RNaseZap® (katalógusszám: AM9780) termékét. Az RNáz-szennyeződés emellett általános laboratóriumi reagensek segítségével is eltávolítható. A műanyagáruk szennyeződésmentesítésére használhat 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA oldatot, majd RNáz-mentes vízzel (lásd „Oldatok”, 24. oldal), vagy kloroformrezisztens műanyagáruk esetén kloroformmal öblítsen. Az elektroforézis-kádak szennyeződésmentesítésére használjon detergenst (pl. 0,5% SDS), majd RNáz-mentes vízzel és etanolrezisztens kádak esetén etanollal öblítsen és hagyja megszáradni.

## Egyszer használatos műanyagáruk

A teljes eljárás során steril, RNáz-mentes, egyszer használatos polipropilén tesztcsövek használata javasolt. Az ilyen csövek általában RNáz-mentesek, ezért az RNáz enzimek inaktiválását célzó előkezelésük nem szükséges.

## Üvegáruk

Az üvegárukat használatuk előtt RNáz-mentesíteni kell. Az RNS-munkához használatos üvegárukat használat előtt detergenssel tisztítsa, alaposan öblítse le és 240 °C-on legalább 4 órán keresztül (vagy, ha kényelmesebb, egy éjszakán át) autoklávozza. Az autoklávozás önmagában számos RNáz-t nem inaktivál teljes mértékben. Másik lehetőségként az üvegárukat az alább, „Oldatok” részben leírtaknak megfelelően DEPC-vel (dietil-pirokarbonáttal) kezelje.

## Oldatok

Az oldatokat (vizet és egyéb oldatokat) 0,1% DEPC-vel kezelje. A DEPC az RNázok erős, de nem abszolút gátlószere. Az üvegáruk, illetve műanyagáruk RNáz-mentesítésére, vagy RNáz-mentes víz, illetve oldat készítéséhez általában 0,1%-os koncentrációban alkalmazzák. A DEPC az RNázokat kovalens módosítás révén inaktiválja. A kezelendő oldat 100 ml-éhez adjon 0,1 ml DEPC-et és erőteljes rázás segítségével oldja fel. Inkubálja az oldatot 37 °C-on 12 órán át. A nyomokban hátramaradt DEPC-et 15 perc autoklávozással távolítsa el. A DEPC a primer aminokkal reakcióba lép és Tris pufferek közvetlen kezelésére nem alkalmas. A DEPC Tris pufferekben nagyon instabil és gyorsan etanollá és CO<sub>2</sub>-vé bomlik. Tris pufferek készítésekor kezelje a vizet DEPC-vel, majd a Trist ebbe oldja fel, hogy a megfelelő puffert elkészíthesse. Az RNS molekulák purinbázisait a legcsekélyebb mennyiségű DEPC is módosítja. Sejtmentes rendszerekben az így módosított RNS transzlációs hatékonysága nagyon alacsony. Amennyiben a purinbázisok csak kis arányban módosultak, a DNS:RNS és RNS:RNS hibridek kialakulásának esélye csekély mértékben érintett. Az oldatokban, illetve edényekben hátramaradó DEPC-et autoklávozással, vagy 100 °C-os 15 perces hőkezeléssel mindíg el kell távolítani.

**Megjegyzés:** Az RNeasy pufferek garantált RNáz-mentessége nem DEPC-kezelésen alapszik, ezért ezek biztosan nem tartalmaznak DEPC-szennyeződést.



## Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Column, elúciós cső, mosócső, líziscső, RNáz-mentes reagensek és pufferek	73604

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében, vagy felhasználói kézikönyvében található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói kézikönyvei a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) webhelyen érhetők el, illetve a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

---

## Megjegyzések

#### **Korlátozott licencszerződés az RNeasy DSP FFPE Kit használatához**

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A termék kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a kíthez tartozó komponensekkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a kíthez tartozó komponenseket a termékhez mellékelt protokollokban, a jelen kézikönyvben és a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a kíthez tartozó komponensekbe beépítsék, vagy azokkal együtt használják. A további protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsátják más QIAGEN felhasználók rendelkezésére. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sértik harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licenccen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a kit és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A kit és komponenseinek licence csak egyszeri használatra jogosít; a komponensek újrafelhasználása, felújítása vagy újraértékesítése tilos.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A kit vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztüli érvényesítésére és az azzal kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a kittel és/vagy komponenseivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárás ügyvédi költségeit.

A legújabb licenccfeltételekről a [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oldalon tájékozódhat.

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific vagy leányvállalatai).  
A dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. akkor sem tekinthetők a törvényi védelmen kívül esőnek, ha nem rendelkeznek külön jelöléssel.  
08/2017 HB-2416-001 1106945 © 2012–2017 QIAGEN, minden jog fenntartva.

---

Rendelés: [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Műszaki támogatás: [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Webhely: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)