




Características de rendimiento

Kit RNeasy® DSP FFPE, versión 1

REF 73604

Gestión de versiones

Este documento es Características del rendimiento del kit RNeasy DSP FFPE, versión 1, R1.

  	Compruebe la disponibilidad de nuevas versiones de la documentación electrónica en www.qiagen.com/HB-2416 antes de realizar el ensayo. El estado de revisión actual viene indicado por la fecha de publicación (formato: mes/año).
---	--

Introducción general

El kit RNeasy DSP FFPE está previsto para la purificación de ARN total a partir de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

El producto está concebido para que lo utilicen usuarios profesionales, como técnicos y médicos formados en técnicas de biología molecular. Utiliza un protocolo basado en una columna de centrifugado de sílice optimizada e incluye la extracción enzimática de ADN residual.

El kit RNeasy DSP FFPE aísla las moléculas de ADN de más de 70 nucleótidos y permite recuperar los fragmentos de ARN utilizables para aplicaciones como la RCP inmediata.

Rendimiento del ARN purificado

El rendimiento básico del kit RNeasy DSP FFPE se evaluó utilizando muestras FFPE de 5 tejidos humanos diferentes (mama, colon, pulmón, melanoma maligno y piel normal; 20 muestras de cada uno).

Las muestras FFPE pueden mostrar un alto grado de heterogeneidad tisular. Además, el área superficial del tejido puede variar en gran medida en las muestras FFPE, lo que puede originar una cantidad variable de ADN extraído. Por consiguiente, el usuario deberá optimizar el número de cortes, su grosor y área superficial en sus muestras de interés y en los procedimientos empleados en su laboratorio.

Si se utiliza el kit junto con una aplicación QIAGEN® posterior, consulte el correspondiente manual para obtener instrucciones.

Una deshidratación tisular insuficiente durante la preparación de tejido FFPE, la adición de un exceso de parafina con la muestra en el tubo de extracción, el uso de etanol de menor pureza (en lugar de etanol de calidad apta para biología molecular) que la recomendada o la conservación del etanol en la muestra pueden llevar a que la extracción no sea óptima y la cantidad de ADN sea baja o el rendimiento futuro se reduzca.

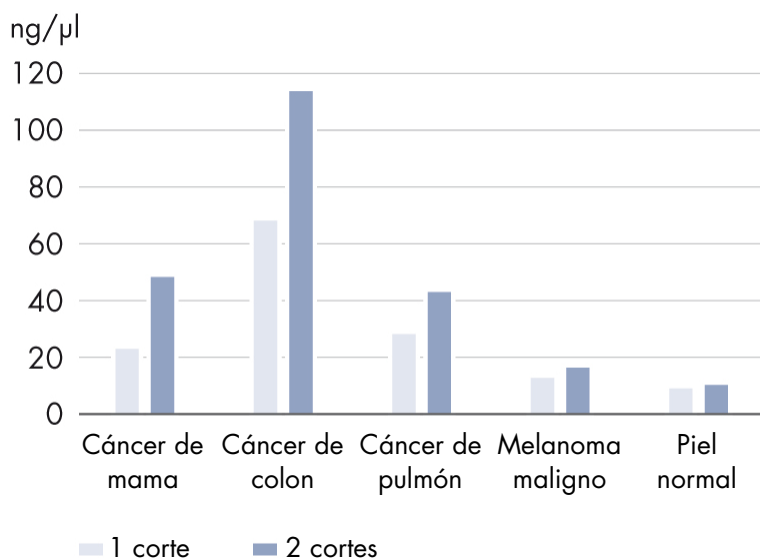


Figura 1. El rendimiento del ARN de diferentes tejidos humanos (volumen de elución de 32 μl)

Análisis posteriores

El ADN eluido está listo para ser utilizado en ensayos posteriores. Para evaluar el rendimiento, se aislaron 10 ng de ARN con el kit RNeasy DSP FFPE de 5 tejidos humanos diferentes (mama, colon, pulmón, melanoma maligno y piel normal; 20 muestras que constaban de uno o dos cortes) y se validaron utilizando RCP inmediata dirigida al gen de β-actina humano. La amplificación se realizó correctamente y mostró que el ARN aislado con el kit RNeasy DSP FFPE puede utilizarse para un análisis posterior.

El usuario deberá optimizar el número de cortes, su grosor y área superficial en sus muestras de interés y en cualquier procedimiento posterior empleado en su laboratorio o consulte el rendimiento específico del ensayo posterior correspondiente.

	Cáncer de mama	Cáncer de colon	Cáncer de pulmón	Melanoma maligno	Piel normal
RCP inmediata 1 corte	✓	✓	✓	✓	✓
RCP inmediata 2 cortes	✓	✓	✓	✓	✓

Figura 2. La amplificación correcta con RCP inmediata de los cortes FFPE de 10 µm se realizó en cinco tejidos humanos diferentes analizados.

Estabilidad del eluido

La estabilidad del eluido dependerá del contenido y del tipo de impurezas copurificadas (relacionadas con el tipo de tejido), del tipo de elución y de las condiciones de almacenamiento. Recomendamos que los usuarios determinen la estabilidad del eluido según sus requisitos particulares.

La estabilidad del eluido analizado de las muestras de ARN humano derivadas de FFPE almacenadas a temperaturas de -15 °C a -30 °C y de -60 °C a -90 °C . No se observó deterioro durante un máximo de 12 semanas y los eluidos almacenados a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C) se mantuvieron estables hasta un máximo de 12 horas. Todas las condiciones se evaluaron mediante RCP inmediata dirigida al gen de β -actina humano.

Si se utiliza el kit junto con aplicaciones QIAGEN posteriores, consulte el correspondiente manual del kit para obtener instrucciones.

Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó utilizando muestras FFPE de glóbulos sanguíneos humanos nucleados. Las muestras se analizaron con un ensayo validado internamente para fragmentos de 295 bp del gen de β -actina humano en un cicladador de RCP inmediata ABI® 7900.

Para el análisis estadístico, se utilizaron 108 puntos de datos de tres partidas de extracción (mismo lote del kit, operador, día). El análisis estadístico incluyó el cálculo de la desviación estándar (SD) y del coeficiente de variación (CV) de los valores C_T derivados a partir de la RCP inmediata de β -actina. La SD fue 1,1 C_T y el coeficiente de variación fue del 4,1 % (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados de repetibilidad

Repetibilidad			
	C_T medio	SD	CV (%)
Lote 1	26,64	1,01	3,81
Lote 2	27,51	1,16	4,2
Lote 3	27,23	0,95	3,5
Lote 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Reproducibilidad

La reproducibilidad se llevó a cabo evaluando extracciones de ARN a partir de muestras FFPE de glóbulos sanguíneos humanos nucleados con diferentes operadores, en diferentes días y con diferentes operadores en diferentes días. Las muestras se analizaron con un ensayo validado internamente para fragmentos de 295 bp del gen de β -actina humano en un ciclador de RCP inmediata ABI 7900. Para el análisis estadístico, se utilizaron 108 puntos de datos de tres partidas de extracción en cada prueba. El análisis estadístico incluyó el cálculo de la desviación estándar (SD) y del coeficiente de variación (CV) de los valores C_T derivados a partir de la RCP inmediata de β -actina (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de reproducibilidad

Reproducibilidad			
	C_T medio	SD	CV (%)
Operadores diferentes	26,92	1,06	3,95
Días diferentes	26,56	1,20	4,53
Operadores y días diferentes	26,63	1,01	3,78

Linealidad

El kit RNeasy DSP FFPE se puede utilizar para el aislamiento de ARN procedente de diferentes tipos de tejido FFPE. El sistema se validó para el uso de 1-4 cortes de glóbulos sanguíneos humanos nucleados FFPE y se demostró un aumento lineal del rendimiento de ARN. Debe establecerse un intervalo lineal según los requisitos del cliente y validarse para cada uso particular. Se prevén diferentes rangos lineales en los diferentes tipos de tejidos, en función de la carga tisular en el sistema, así como de las características del tejido y de los ensayos posteriores.

Sustancias interferentes

Las sustancias potencialmente interferentes pueden proceder de diferentes orígenes, como metabolitos naturales específicos del tipo de tejido y órgano, metabolitos producidos durante estados patológicos, sustancias introducidas durante tratamientos del paciente o sustancias ingeridas por el paciente. Debido a la complejidad de las sustancias potencialmente interferentes y de la diferente sensibilidad de las aplicaciones posteriores específicas, recomendamos que los usuarios evalúen el efecto de las sustancias interferentes para sus propios sistemas y validen el método de control de interferencias en su aplicación posterior de diagnóstico específica.

No se observaron sustancias interferentes derivadas de componentes del kit RNeasy DSP FFPE durante el procesamiento de las muestras y la extracción de ARN.

Para obtener más información sobre sustancias interferentes en aplicaciones posteriores específicas de QIAGEN, consulte los manuales del kit.

Contaminación cruzada

Para evaluar el nivel de contaminación cruzada, se añadieron 500 ng de ARN total de sangre a la solución de desparafinado y se aisló junto a tubos que no contenían ARN (tubos de extracción negativa). El estudio tenía como fin simular las condiciones en las que las muestras con un elevado nivel de moléculas diana de ARN pueden realizar una contaminación cruzada de otras muestras dentro del procedimiento de extracción. La purificación del ARN se realizó con un lote de reactivos. La contaminación cruzada se evaluó mediante RCP inmediata dirigida al gen de β -actina humano. Los resultados mostraron ausencia de contaminación cruzada en todo el sistema.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit QIAGEN correspondiente. Los manuales y los manuales del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

Pedidos www.qiagen.com/contact | Servicio técnico support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com