

Agosto 2017

Instrucciones de uso (manual) del kit RNeasy[®] DSP FFPE



Versión 1
Para uso diagnóstico in vitro

IVD Para uso diagnóstico in vitro



REF 73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania

R1 **MAT** 1106945ES

Contenido

Uso previsto	3
Resumen y explicación	3
Principios del procedimiento	4
Materiales suministrados	6
Contenido del kit.....	6
Materiales requeridos pero no suministrados	7
Advertencias y precauciones.....	8
Conservación y manipulación de los reactivos	10
Componentes del kit	10
Notas importantes	11
Preparación de soluciones tampón	12
Procedimiento	14
Protocolo: Purificación de ARN total a partir de cortes de tejido FFPE.....	15
Control de calidad.....	19
Limitaciones	19
Símbolos	20
Guía de resolución de problemas.....	22
Apéndice: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN.....	24
Información para pedidos	26

Uso previsto

El kit RNeasy DSP FFPE es un sistema 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 optimizado que se basa en una columna de centrifugado de sílice e incluye la extracción enzimática de ADN residual.

El kit RNeasy DSP FFPE se ha diseñado para diagnóstico *in vitro*

Resumen y explicación

El kit RNeasy DSP FFPE está diseñado especialmente para la purificación de ARN total a partir de cortes de tejido fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE). Al aislar las moléculas de ADN de más de 70 nucleótidos, el kit permite recuperar los fragmentos de ARN utilizables para aplicaciones como la retrotranscripción asociada a RCP.

Debido a las condiciones de fijación e inclusión, el formaldehído suele fragmentar y modificar los ácidos nucleicos de las muestras FFPE desde el punto de vista químico. Por lo tanto, los ácidos nucleicos aislados de muestras FFPE a menudo poseen un peso molecular inferior al de los procedentes de muestras frescas o congeladas. El grado de fragmentación depende del tipo y de la antigüedad de la muestra, así como de las condiciones empleadas para la fijación, la inclusión y el almacenamiento de la muestra. Para la normalización de los procesos previos al análisis para tejido FFPE, recomendamos proceder según la norma CEN CEN/TS 16827-1_2015.

Si bien la modificación mediante formaldehído no puede detectarse en los ensayos de control de calidad estándar, como la electroforesis en gel o el análisis de laboratorio en un chip, interfiere en gran medida con los análisis enzimáticos.

Si bien el kit RNeasy DSP FFPE se ha optimizado para invertir tanta modificación mediante formaldehído como sea posible sin degradación adicional del ARN, no deben usarse ácidos nucleicos purificados de muestras FFPE en aplicaciones posteriores que requieren ARN de secuencia completa. Es posible que ciertas aplicaciones requieran modificaciones para permitir el uso de ARN fragmentado (p. ej., diseño de amplicones de tamaño reducido para retrotranscripción asociada a RCP). Para la síntesis de ADNc, debe usarse cualquier cebador aleatorio o específico de los genes en lugar de cebadores oligo-dT.

La tinción de cortes FFPE también puede afectar a la calidad y al rendimiento del ARN en aplicaciones posteriores. Esto sucede especialmente con muchos protocolos de tinción inmunohistoquímica

Principios del procedimiento

El procedimiento de RNeasy DSP FFPE utiliza tecnología RNeasy de eficacia comprobada para la purificación de ARN. Las condiciones de lisis especialmente optimizadas permiten la purificación eficaz del ARN total a partir de cortes de tejido FFPE. El paso de digestión de DNAsas I elimina de manera eficaz la contaminación del ADN, incluidas las moléculas con un elevado grado de fragmentación.

Primero, se retira toda la parafina de los cortes de tejido FFPE recientemente realizados al tratarlos con solución de desparafinado. Luego, las muestras se incuban en un tampón de lisis optimizado, que contiene proteinasa K para liberar ARN de los cortes. Una breve incubación a mayor temperatura invierte parcialmente el entrecruzamiento de formalina de los ácidos nucleicos liberados, lo que mejora la cantidad obtenida de ARN y su calidad, y también el rendimiento del ARN en ensayos enzimáticos posteriores. A continuación, se realiza el tratamiento de DNAsas I que se ha optimizado para eliminar el ADN genómico, incluidos fragmentos de ADN de tamaño muy reducido que suelen encontrarse en muestras

FFPE después de la fijación prolongada en formalina o de tiempos de almacenamiento prolongados. A continuación, el lisado se mezcla con tampón RBC. Se añade etanol para proporcionar las condiciones de unión adecuadas para el ARN, luego la muestra se aplica a una columna de centrifugado RNeasy MinElute, donde el ARN total se une a la membrana y los contaminantes se eliminan de manera eficaz. Posteriormente, el ADN se eluye en una cantidad mínima de 14 µl de agua sin ARNasa.

Procedimiento de RNeasy DSP FFPE

Cortes de tejido FFPE



Figura 1. Procedimiento de purificación de ARN de tejido FFPE con el kit RNeasy DSP FFPE.

Materiales suministrados

Contenido del kit

Kit RNeasy DSP FFPE		(50)	
N.º de referencia		73604	
Número de preparaciones		50	
	Denominación	Símbolos	Cantidad
Centrifugado RNeasy MinElute	RNeasy MinElute® Spin Columns (pink) (Columnas de centrifugado RNeasy MinElute® [rosa]) (cada una en un tubo de obtención de muestras de 2 ml)	COL	50
ET	Elution Tubes (Tubos de elución) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lisis) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Tubos de lavado) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution (Solución de desparafinado)	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC* (Tampón RBC*)	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD (Tampón PKD)	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (Proteinasa K)	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (lyophilized) (ADNasa sin ARNasa I [liofilizada])	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (Agua sin ARNasa)	ELU DIL	3 de 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer (Tampón de ADNasa potenciado)	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE [†] (concentrate) (Tampón RPE [†] [concentrado])	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v1	RNeasy DSP FFPE Kit Handbook (Manual del kit RNeasy DSP FFPE)		1

*Contiene una sal de guanidina. No es compatible con desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 8 si desea obtener información relativa a la seguridad.

Antes de utilizarlo por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol (96 %-100 %), tal como se indica en la botella y como se describe en la página 12 para obtener una solución de trabajo.

Materiales requeridos pero no suministrados

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (safety data sheets, SDS) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

- Puntas de pipetas y pipetas estériles y libres de ARNasas
- Microcentrifugadora (con rotor para tubos de 2 ml)
- Agitador vorticial
- Etanol al 100 % (no utilice alcohol desnaturalizado, que contiene otras sustancias como metanol o metiletilcetona)
- Guantes desechables
- Bloque calefactor con función de agitación capaz de incubar a 56 °C y a 80 °C

Advertencias y precauciones

Para uso diagnóstico in vitro.

Lea atentamente todas las instrucciones antes de utilizar el kit.

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Para obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

ADVERTENCIA Riesgo de lesiones personales



NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de muestras.

Los tampones del kit RNeasy DSP FFPE contienen azida sódica. Si se derrama tampones de los kit, límpielos con un detergente de laboratorio adecuado y agua. Si el líquido derramado contiene agentes potencialmente infecciosos, limpie el área afectada con detergente de laboratorio y agua en primer lugar y, a continuación, con solución de hipoclorito de sodio al 1 % (v/v).

Las siguientes frases relativas a los riesgos y a las medidas de precaución son aplicables al kit RNeasy DSP FFPE.

PKD, RPE, RNF, DBB

Contiene: Azida sódica. ¡Advertencia! Puede ser nocivo en caso de ingestión. Llame a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico en caso de malestar.

DSP



Contiene:hexadecano. ¡Peligro! Puede ser mortal en caso de ingestión y penetración en las vías respiratorias. La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. NO provocar el vómito. EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. Guardar bajo llave.

Proteinasa K



Contiene: proteinasa K. ¡Peligro! Provoca irritación cutánea leve. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. EN CASO DE INHALACIÓN: Si respira con dificultad, transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Llevar equipo de protección respiratoria.

ADNasa I



Contiene: desoxirribonucleasa. ¡Peligro! Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. En caso de síntomas respiratorios: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico. EN CASO DE INHALACIÓN: Si respira con dificultad, transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección. Llevar equipo de protección respiratoria.

RBC



Contiene: clorhidrato de guanidina. ¡Advertencia! Nocivo en caso de ingestión o de inhalación. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico en caso de malestar. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

DBB



Contiene: cloruro cálcico, cloruro de hidrógeno. ¡Advertencia! Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico. Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

Conservación y manipulación de los reactivos

Las columnas de centrifugado RNase-Free DNase I y RNeasy MinElute deben almacenarse a 2-8 °C inmediatamente al recibirse. Los tampones pueden guardarse a temperatura ambiente (15 °C-25 °C). En estas situaciones, el kit puede almacenarse según lo establezca la fecha de caducidad de la etiqueta de la caja sin afectar de forma alguna al rendimiento.

No utilice el kit RNeasy DSP FFPE si ha caducado.

Componentes del kit

La fecha de caducidad de cada reactivo figura en las etiquetas de cada componente. En las condiciones de almacenamiento adecuadas, el producto mantendrá su rendimiento durante el período de estabilidad siempre que se utilicen los mismos lotes de componentes.

Para el almacenamiento prolongado de ADNasa I después de la reconstitución, retire la solución matriz del vial, divídala en alícuotas de un solo uso y almacénelas a una temperatura de -15 a -30 °C durante hasta 9 meses. Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a 2-8 °C durante un máximo de 6 semanas. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.

Evite la exposición de los reactivos a la luz ultravioleta (p. ej., utilizada para la descontaminación), ya que dicha exposición puede causar un envejecimiento acelerado.

Notas importantes

Material de partida

La fijación con formalina y los procedimientos de inclusión en parafina convencionales provocan siempre una fragmentación y un entrecruzamiento importantes de los ácidos nucleicos. Para limitar el grado de fragmentación y el entrecruzamiento del ácido nucleico, asegúrese de:

- Usar muestras de tejido de menos de 5 mm de espesor para que la formalina penetre por completo
- Fijar las muestras de tejido con formalina con tampón neutro del 4 % al 10 % tan rápido como sea posible tras la extracción quirúrgica.
- Aplicar un tiempo de fijación máximo de 24 horas (los tiempos de fijación superiores producen una fijación excesiva y una fragmentación más intensa del ADN, lo cual provoca un rendimiento deficiente en ensayos posteriores)
- Deshidratar completamente las muestras antes de la inclusión
- Usar parafina de bajo punto de fusión para la inclusión

El material de partida para la purificación del ARN debe estar compuesto por cortes recientes de tejido FFPE, cada uno con un espesor de hasta 20 μm . Los cortes más gruesos pueden dar lugar a rendimientos inferiores de ácidos nucleicos, incluso después de una incubación prolongada con proteinasa K. En una preparación pueden combinarse hasta 4 cortes, cada uno de 10 μm de espesor. Pueden combinarse más de 4 cortes si la suma total de los espesores de los cortes es de 40 μm o menos (p. ej., ocho cortes de 5 μm de espesor).

En el caso de tejidos con un contenido de ADN particularmente alto, recomendamos usar menos cortes por preparación para evitar la contaminación por ADN del ARN purificado.

Si no se dispone de información acerca de la naturaleza de su material de partida, le recomendamos que comience con no más de 2 cortes en cada preparación. En función del rendimiento y de la pureza del ADN es posible utilizar un máximo de 4 cortes en las preparaciones subsiguientes. Sin embargo, la sobrecarga de la columna de centrifugado RNeasy MinElute podría reducir considerablemente el rendimiento y la calidad del ARN.

Preparación de soluciones tampón

Preparación de la solución matriz de ADNasa I

Para preparar la solución matriz de ADNasa I, disuelva la ADNasa I liofilizada en 550 µl de agua sin ARNasas. Para evitar la pérdida de ADNasa, no abra el vial. Inyecte agua sin ARNasas en el vial con una aguja y una jeringa sin ARNasas. Invierta el vial para mezclar suavemente. No la agite en el agitador vorticial.

En algunos casos, el vial de ADNasa I puede parecer vacío. Esto se debe a que la enzima liofilizada se adhiere a la membrana de goma. Para evitar la pérdida de ADNasa, no abra el vial. En lugar de ello, disuelva la ADNasa I con una aguja y una jeringa como se describe a continuación.

Nota: la ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización física. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el vial con suavidad.

Nota: asegúrese de que se inyecte el volumen completo de agua sin ARNasa en el vial.

El material insoluble puede permanecer después de la disolución de la ADNasa I. Debido al proceso de producción, el material insoluble puede presentarse en la ADNasa I liofilizada. Esto no afecta al rendimiento de la ADNasa I.

Para el almacenamiento prolongado de ADNasa I, retire la solución matriz del vial, divídala en alícuotas de un solo uso y almacénelas a una temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta 9 meses. Las alícuotas descongeladas pueden conservarse a $2-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 6 semanas. No vuelva a congelar las alícuotas una vez descongeladas.

Preparación del tampón RPE

Añada 4 volúmenes (44 ml) de etanol (96 %-100 %) al frasco que contiene 11 ml de tampón RPE concentrado. Marque la casilla de verificación de la etiqueta del frasco para indicar que se ha añadido etanol.

Nota: antes de comenzar el procedimiento, mezcle el tampón RPE reconstituido agitándolo.

Procedimiento

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Si es la primera vez que usa el kit RNeasy DSP FFPE, lea las “Notas importantes” (página 11)
- Si es la primera vez que trabaja con ARN, lea “Apéndice; Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN” (página 24).
- El tampón RBC contiene sal de guanidina y, por lo tanto, no es compatible con reactivos desinfectantes que contengan lejía. Consulte la página 8 si desea obtener información relativa a la seguridad.
- A menos que se indique lo contrario, realice todos los pasos del procedimiento a temperatura ambiente (15 °C-25 °C). Durante el procedimiento, trabaje con rapidez, no haga pausas.
- Lleve a cabo todos los pasos de centrifugado utilizando una microcentrifugadora a 15 °C-25 °C. Si utiliza una microcentrifugadora refrigerada, establezca la temperatura en 20 °C-25 °C; de lo contrario, se puede producir un enfriamiento considerable por debajo de los 15 °C.
- En el procedimiento descrito a continuación, ▲ indica los volúmenes a utilizar si se van a procesar 1-2 cortes por muestra, mientras que ● indica los volúmenes a utilizar si se van a procesar >3-4 cortes por muestra.
- Si va a utilizar el tampón RPE y ADNasa I sin ARNasa por primera vez, reconstitúyalos como se describe en “Preparación de tampones” (página 12)
- Deje que todos los tampones alcancen la temperatura ambiente (15 °C-25 °C). Agite el tampón RPE reconstituido para mezclarlo
- Ajuste una mezcladora térmica a 56 °C para su uso en los pasos 5 y 9. Para reducir el tiempo de espera, ajuste una segunda mezcladora térmica a 80 °C para su uso en el paso 9.
- **Nota:** no detenga el procedimiento de purificación antes de que finalice, ya que un mayor tiempo de incubación puede causar la pérdida o la degradación del ARN. El tiempo de procesamiento promedio de hasta 12 muestras en paralelo es de aproximadamente 130 minutos.

Protocolo: Purificación de ARN total a partir de cortes de tejido FFPE

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.
 2. Prepare cortes de 5-20 μm de espesor.
Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine los primeros 2 a 3 cortes.
 3. Inmediatamente, coloque los cortes en un tubo de microcentrifugadora de ▲ 1,5 ml o ● 2 ml y cierre la tapa.
 4. Añada ▲ 160 μl o ● 320 μl de solución de desparafinado, agite enérgicamente en agitador vorticial durante 10 segundos y centrifugue brevemente para que la muestra decante al fondo del tubo.
 5. Incube a 56 °C durante 3 minutos y espere a que se enfríe durante 5 minutos a temperatura ambiente.
Si se utiliza una cantidad demasiado baja de solución de desparafinado o si se arrastra demasiada parafina con la muestra, es posible que la solución de desparafinado se torne cerosa o sólida después de enfriarse. Si esto ocurre, añada solución de desparafinado en pasos de 160 μl y repita el paso 5.
 6. Añada ▲ 150 μl o ● 240 μl de tampón PKD y mezcle en agitador vorticial durante 3 segundos.
 7. Centrifugue durante 1 minuto a 11.000 x g.
 8. Añada 10 μl de proteinasa K a la fase transparente más baja y mezcle mediante pipeteado 10 veces hacia arriba y abajo (no mezcle fases separadas).
 9. Incube a 56 °C durante 15 minutos a 1.100 rpm; posteriormente, a 80 °C durante 15 minutos a 1.100 rpm.
Si emplea un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56 °C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 80 °C.
- Nota:** no es necesaria la digestión completa del tejido mediante proteinasa K para el rendimiento máximo de ARN; sin embargo, el paso de incubación a 80 °C es fundamental.

IMPORTANTE: Asegúrese de que el bloque de calentamiento haya alcanzado los 80 °C antes de iniciar la incubación de 15 minutos. La incubación durante 15 minutos a 80 °C es fundamental para la inversión de los entrecruzamientos de formaldehído y un rendimiento óptimo del ARN en las aplicaciones posteriores como la retrotranscripción asociada a RCP.

10. Centrifugue un momento y transfiera ▲ 145 µl o ● 230 µl de la fase incolora más baja a un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml.
11. Incube sobre hielo durante 3 minutos. Luego, centrifugue durante 15 minutos a 20.000 x g.
12. Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de la microcentrifugadora de 2 ml teniendo cuidado de no alterar el sedimento.

El sedimento contiene residuos de tejido insolubles, incluido ADN entrecruzado.

13. Añada tampón de ADNasa potenciado equivalente a un décimo del volumen total de la muestra (▲ 14,5 µl o ● 23 µl) y 10 µl de solución matriz de ADNasa I. Invierta el tubo para mezclar. Centrifugue brevemente para que el líquido residual de los laterales del tubo se deposite.

Nota: la ADNasa I se proporciona liofilizada y debe reconstituirse tal como se describe en "Preparación de la solución matriz de ADNasa I", página 12.

Nota: la ADNasa I es especialmente sensible a la desnaturalización. Debe mezclarse únicamente invirtiendo el tubo con suavidad. No la agite en el agitador vorticial.

14. Incube a temperatura ambiente durante 15 minutos.
15. Añada ▲ 320 µl o ● 500 µl de tampón RBC para ajustar las condiciones de unión, mezcle el lisado de forma exhaustiva en el agitador vorticial durante 3 segundos y centrifugue brevemente.
16. Añada ▲ 720 µl o ● 1200 µl de etanol (100 %) a la muestra. No centrifugue la mezcla. Continúe de inmediato por el paso 17.

Después de añadir el etanol, es posible que puedan verse precipitados. Esto no afecta el procedimiento.

17. Mezcle bien mediante pipeteo 5 veces arriba y abajo y transfiera 700 µl de la muestra, incluido cualquier precipitado que pueda haberse formado, a una columna de centrifugado RNeasy MinElute colocada en un tubo de obtención de muestras de 2 ml. Cierre la tapa con suavidad y centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$. Deseche el tubo de obtención de muestras con el flujo continuo* y coloque la columna en un nuevo tubo (proporcionado).

18. Repita el paso 17 (sin mezclar más) hasta que toda la muestra haya pasado a través de la columna de centrifugado RNeasy MinElute.

19. Añada 500 µl de tampón RPE a la columna de centrifugado RNeasy MinElute. Cierre la tapa con suavidad y centrifugue durante 15 segundos a $\geq 8.000 \times g$. Deseche el tubo de obtención de muestras con el flujo continuo* y coloque la columna en un nuevo tubo (proporcionado).

Nota: el tampón RPE se suministra como concentrado. Asegúrese de añadir etanol antes de utilizarlo tal como se describe en "Preparación del tampón RPE".

20. Añada 500 µl de tampón RPE a la columna de centrifugado RNeasy MinElute. Cierre la tapa con suavidad y centrifugue durante 2 minutos a $\geq 8.000 \times g$ para lavar la membrana de la columna de centrifugado. Deseche el tubo de obtención de muestras con el flujo continuo* y coloque la columna en un nuevo tubo (proporcionado).

Nota: después de la centrifugación, retire con cuidado la columna de centrifugado RNeasy MinElute del tubo de recogida para que no entre en contacto con el flujo continuo. De lo contrario, se podría producir una contaminación por arrastre de etanol.

* El flujo continuo contiene tampón RBC, por lo que no es compatible con la lejía. Consulte la página 8 si desea obtener información relativa a la seguridad.

21. Abra la tapa de la columna de centrifugado y centrifugue a máxima velocidad durante 5 minutos. Deseche el tubo de obtención de muestras con el flujo continuo.

Para evitar el deterioro de las tapas, sitúe las columnas de centrifugado en la centrifugadora con al menos una posición vacía entre las columnas. Coloque las tapas de modo que estén orientadas hacia la dirección opuesta a la rotación del rotor (p. ej., si el rotor gira en el sentido de las agujas del reloj, oriente las tapas en sentido antihorario).

Es importante secar la membrana de la columna de centrifugado, puesto que los restos de etanol pueden interferir en las reacciones posteriores. El centrifugado con las tapas abiertas evita el arrastre de etanol durante la elución de ARN.

22. Sitúe la columna de centrifugado RNeasy MinElute en un tubo nuevo de obtención de muestras de 1,5 ml (suministrado). Añada 14-32 μ l de agua sin ARN directamente en el centro de la membrana de la columna de centrifugado. Cierre la tapa con suavidad y centrifugue durante 1 minuto a máxima velocidad para eluir el ARN.

La elución con volúmenes menores de agua sin ARN produce mayores concentraciones totales de ARN, pero menores cantidades de ARN.

Nota: cuando se obtengan cantidades inferiores y esperadas de ARN, se recomienda un tubo de baja unión para la elución (no se proporciona). El volumen muerto medio de la columna de centrifugado RNeasy MinElute es 2 μ l: la elución con 14 μ l de agua sin ARN produce unos 12 μ l de eluido.

23. Almacene los eluidos de ARN a una temperatura de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ o de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta 8 semanas.

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del kit RNeasy DSP FFPE se analiza a partir de las especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Limitaciones

El rendimiento del sistema se ha establecido en estudios de evaluación del rendimiento en los que se purificó ARN humano a partir de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina.

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema para cualquier procedimiento utilizado en su laboratorio que no esté cubierto por los estudios de evaluación del rendimiento de QIAGEN.

Para reducir al mínimo el riesgo de un efecto negativo sobre los resultados diagnósticos, deben utilizarse suficientes controles para las aplicaciones posteriores.

La interpretación de los resultados de diagnóstico obtenidos debe realizarse en combinación con otros resultados clínicos o de laboratorio.

Símbolos

En estas instrucciones de uso se utilizan los símbolos incluidos en la tabla siguiente.



<N>

Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones



Fecha de caducidad



Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*



A su recepción



DN



Centrifugado RNeasy MinElute



Número de referencia



Número de lote



Número de material (es decir, etiquetado del componente)



Componentes (lista de los elementos incluidos)

CONT

Contiene (contenido)

NUM

Número (para viales, botellas, etc.)

GTIN

Número mundial de artículo comercial

Rn

R es la revisión del Manual de instrucciones de uso,
y n es el número de revisión



Limitación de temperatura



Fabricante



Consultar las instrucciones de uso



Precaución

PROTK

Proteínasa K

Sodium azide

Azida sódica

Guía de resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de servicio técnico:

www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información o los protocolos de este manual, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en **www.qiagen.com**).

Comentarios y sugerencias

Columna de centrifugada RNeasy MinElute taponada

- | | |
|---|---|
| a) Demasiado material de partida | Reduzca la cantidad de material de partida. Es fundamental usar la cantidad correcta de material de partida (consulte la página 11). |
| b) La temperatura de centrifugado es demasiado baja | La temperatura de centrifugado debe oscilar entre 15 °C y 25 °C. Algunas centrifugadoras pueden enfriarse por debajo de los 15 °C incluso cuando se ajustan a 20 °C. Esto puede causar la formación de precipitados que pueden obstruir la columna de centrifugado RNeasy MinElute. Si sucede esto, ajuste la temperatura de centrifugado en 25 °C. |

Baja cantidad obtenida de ARN

- | | |
|--|---|
| a) Material de partida de baja calidad | Las muestras que estuvieron fijadas durante más de 24 horas y se almacenaron durante periodos muy prolongados pueden contener escaso ARN utilizable. Los cortes que se montaron en portaobjetos pueden tener un escaso rendimiento de ARN utilizable debido a la exposición prolongada al aire. |
| b) Demasiado material de partida | El hecho de sobrecargar la columna de centrifugado RNeasy MinElute reduce considerablemente la cantidad obtenida de ácidos nucleicos. Reduzca la cantidad de material de partida (consulte la página 11). |
| c) Sigue habiendo ARN unido a la columna de centrifugado RNeasy MinElute | Repita la elución del ARN, pero incube la columna de centrifugado RNeasy MinElute en la mesa durante 10 minutos con RNFw antes del centrifugado. |
| d) Almacenamiento incorrecto de tampones o reactivos | Las columnas de centrifugado RNeasy MinElute y la ADNasa I deben almacenarse a 2 °C-8 °C al recibir el kit. Compruebe que la temperatura de almacenamiento sea correcta, dado que la exposición a las temperaturas más elevadas durante periodos más prolongados puede causar la pérdida de la funcionalidad. |

Comentarios y sugerencias

Valor A_{260}/A_{280} bajo

- a) Se ha utilizado agua para diluir el ácido nucleico para medir el cociente A_{260}/A_{280} Use 10 mM de Tris Cl con pH 7,5, no agua, para diluir la muestra antes de medir la pureza.

Contaminación por ADN en experimentos posteriores

- a) Demasiado material de partida Para algunos tipos de tejidos, la eficacia de la extracción del ADN puede reducirse al procesar cantidades muy grandes. Si el ARN eludo contiene una contaminación por ADN considerable, intente procesar menos cortes de tejido por preparación.
- b) El tejido tiene un alto contenido de ADN Al procesar cantidades muy grandes de tejidos ricos en ADN (p. ej., timo), es posible que el ADN no se haya digerido por completo. Repita el procedimiento de purificación usando menos cortes de tejido.
Compruebe que la ADNasa I se haya almacenado correctamente según se describe en "Almacenamiento y manipulación de reactivos" y "Preparación de la solución matriz de ADNasa".
- c) Retrotranscripción con cantidad insuficiente de ARN La mayoría de las retrotranscriptasas están previstas para su uso con aproximadamente 1 µg de ARN. Si va a realizar una retrotranscripción con cantidades escasas de ARN, recomendamos usar una retrotranscriptasa que esté diseñada especialmente para la retrotranscripción de alta sensibilidad.

El ARN no tiene un buen rendimiento en ensayos o aplicaciones posteriores.

- a) ARN fragmentado o bloqueado debido a la modificación por formaldehído La incubación a 80 °C en el procedimiento con RNeasy DSP FFPE es fundamental para el rendimiento óptimo del ARN en la retrotranscripción y en otras aplicaciones enzimáticas posteriores.. Asegúrese de que la temperatura de incubación se mantenga a 80 °C durante el tiempo de incubación de 15 minutos. Si bien la incubación a 80 °C elimina parte de las modificaciones mediante formaldehído, el ARN purificado a partir de cortes FFPE no es una matriz óptima para las reacciones enzimáticas. Recomendamos usar solo cebadores aleatorios o cebadores específicos de los genes para la síntesis del ADNc. También recomendamos mantener los amplicones tan cortos como sea posible para la RCP (<500 nucleótidos).
- b) Arrastre de etanol Durante el segundo lavado con tampón RPE, asegúrese de centrifugar a $\geq 8.000 \times g$ durante 2 minutos a 15 °C-25 °C para secar la membrana de la columna de centrifugado RNeasy MinElute. Después del centrifugado, retire con cuidado la columna del tubo de obtención de muestras para que no entre en contacto con el flujo continuo. Posteriormente, coloque la columna en un tubo nuevo de obtención de muestras y centrifugue a máxima velocidad durante 5 minutos.
- c) Arrastre de sal durante la elución de ARN Asegúrese de que el tampón RPE se haya reconstituido al añadir el volumen correcto de etanol y que el tampón esté a temperatura ambiente (15 °C-25 °C).
- d) Retrotranscripción con cantidad insuficiente de ARN La mayoría de las retrotranscriptasas están previstas para su uso con aproximadamente 1 µg de ARN. Si va a realizar una retrotranscripción con cantidades muy pequeñas de ARN, recomendamos usar una retrotranscriptasa que esté diseñada especialmente para la retrotranscripción de alta sensibilidad.

Apéndice: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN

Manipulación del ARN

Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas muy estables y activas que, en general, no requieren cofactores para actuar. Dado que las ARNasas son difíciles de desactivar y se necesitan solamente cantidades minúsculas para destruir el ARN, no utilice ningún material de plástico o de vidrio sin eliminar antes una posible contaminación con ARNasa. Deben tomarse precauciones extremas para evitar introducir involuntariamente ARNasas en la muestra de ARN durante o después del procedimiento de purificación. Para crear y mantener un entorno sin ARNasa, durante el tratamiento previo y el uso de los recipientes desechables y no desechables y de las soluciones deben adoptarse las siguientes medidas de precaución mientras se trabaja con el ARN.

Manipulación general

Siempre que se trabaje con ARN debe utilizarse una técnica microbiológica aséptica adecuada. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos y constituyen las fuentes más comunes de contaminación por ARNasa. Al manipular los reactivos y las muestras de ARN, use siempre guantes de látex o de vinilo para prevenir la contaminación con ARNasa procedente de la superficie de la piel o de un equipo de laboratorio con polvo. Cámbiese los guantes con frecuencia y mantenga los tubos cerrados siempre que sea posible. Mantenga el ARN purificado en hielo cuando pipetee las alícuotas para aplicaciones posteriores.

Para eliminar la contaminación por ARNasa de las superficies de la mesa, se recomienda usar materiales de plástico y equipos de laboratorio (p. ej., pipetas y cubetas de electroforesis) no desechables y RNaseZap® (n.º de ref. AM9780) de Ambion®. De forma alternativa, puede eliminarse la contaminación por ARNasa utilizando reactivos generales de laboratorio. Para descontaminar el material de plástico, enjuáguelo con 0,1 M de

NaOH, 1 mM de EDTA y luego con agua sin ARNasa (consulte “Soluciones”, página 25) o enjuáguelo con cloroformo si el material de plástico es resistente al cloroformo. Para descontaminar las cubetas de electroforesis, límpielas con detergente (p. ej., SDS al 0,5 %), enjuáguelas con agua sin ARNasa, enjuáguelas con etanol (si las cubetas son resistentes al etanol) y espere a que sequen.

Material de plástico desechable

Se recomienda el uso de tubos de polipropileno desechables estériles durante todo el procedimiento. Esos tubos no suelen contener ARNasas y no requieren pretratamiento para desactivarlas.

Materiales de vidrio

Antes de usarse, los materiales de vidrio deben tratarse para garantizar que no contienen ARNasa. Antes de usarse, los materiales de vidrio utilizados para trabajar con ARN deben limpiarse con detergente, enjuagarse meticulosamente y calentarse en el horno a 240 °C durante 4 horas o más (si se prefiere, durante toda la noche). Muchas ARNasas no se desactivarán por completo si se utiliza solamente el autoclave. Alternativamente, puede tratar los materiales de vidrio con DEPC (dietilpirocarbonato), tal como se describe en “Soluciones”, a continuación.

Soluciones

Las soluciones (agua y otras soluciones) se deben tratar con DEPC al 0,1 %. El DEPC es un inhibidor potente, pero no absoluto, de las ARNasas. Se utiliza habitualmente a una concentración del 0,1 % para desactivar las ARNasas en materiales de vidrio o de plástico o para preparar soluciones y agua sin ARNasas. El DEPC inactiva las ARNasas por medio de una modificación covalente. Añada 0,1 ml de DEPC a 100 ml de la solución que desee tratar y agítela enérgicamente para disolver el DEPC en la solución. Incube la solución durante 12 horas a 37 °C. Colóquelos en el autoclave durante 15 minutos para eliminar cualquier resto de DEPC. El DEPC reaccionará con las aminas primarias y no puede utilizarse directamente para tratar los tampones Tris. El DEPC es altamente inestable en

presencia de tampones Tris y se descompone rápidamente en etanol y CO₂. Cuando prepare tampones Tris, en primer lugar trate el agua con DEPC y a continuación disuelva el Tris para preparar el tampón adecuado. Las cantidades mínimas de DEPC modificarán los residuos de purinas por medio de una carboxilación. El ARN carboxilado es convertido con una eficacia muy baja en sistemas sin células. No obstante, su capacidad de formar híbridos de ADN:ARN o ARN:ARN no se ve gravemente afectada, salvo que se haya modificado una gran fracción de residuos de purinas. El DEPC residual siempre se debe eliminar de las soluciones o de los recipientes en el autoclave o calentándolos a 100 °C durante 15 minutos.

Nota: se garantiza que los tampones de RNeasy no contienen ARNasas sin la necesidad de utilizar tratamientos con DEPC y, por tanto, no están contaminados por DEPC.

Información para pedidos

Producto	Contenido	Referencia
Kit RNeasy DSP FFPE (50)	50 columnas de centrifugado RNeasy MinElute, tubos de elución, tubos de lavado, tubos de lisado, reactivos y tampones sin ARNasas	73604

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.

Notas

Notas

Acuerdo de licencia limitada para los kits RNeasy DSP FFPE

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto debe utilizarse exclusivamente de acuerdo con los protocolos proporcionados con el producto y este manual de uso, así como con los componentes contenidos en el kit. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en estos kits con componentes no incluidos en los mismos, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para otros usuarios. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que estos kits ni su uso no infrinjan los derechos de terceros.
3. Este kit y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario de los kits aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los costes del juicio, incluidos los honorarios de abogacía, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y con sus componentes.

Para obtener los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific o sus filiales). Los nombres registrados, las marcas comerciales, etc. utilizados en este documento, incluso cuando no aparecen marcados como tales, están protegidos por la legislación. 08/2017 HB-2416-001 1106945 © 2012-2017 QIAGEN. Reservados todos los datos.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Asistencia técnica support.qiagen.com | Sitio web www.qiagen.com