

December 2017

Protocolblad QIASymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP en Tissue_HC_200_V7_DSP

Dit document is het *QIASymphony SP-protocolblad*, R3, voor de Tissue_LC_200_V7_DSP en Tissue_HC_200_V7_DSP voor QIASymphony DSP DNA Mini Kit, versie 1.

Algemene informatie

De QIASymphony DSP DNA-kit is bedoeld voor gebruik in de in-vitrodiagnostiek.

Dit zijn protocollen voor purificatie van totaal DNA uit weefsel en FFPE-weefsel (Formalin-fixed, paraffin-embedded) met behulp van de QIASymphony SP en de QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Afhankelijk van het monstertype wordt het gebruik van het weinig inhoud-protocol (Low content, LC) of het veel inhoud-protocol (High content, HC) aangeraden. Weefsel levert meer DNA op wanneer het wordt verwerkt met het HC-protocol, maar het LC-protocol, in combinatie met een klein elutievolume (50 µl), kan worden gebruikt als een hoge DNA-concentratie nodig is. Voor FFPE-weefsel wordt het gebruik van het LC-protocol aangeraden.

LC-protocol (Low content)

| | |
|-----------------------------------|---|
| Kit | QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236) |
| Monstermateriaal | FFPE-weefsel en weefsel* Er kunnen in één preparatie maximaal 4 FFPE-weefselcoupes, elk met een dikte van maximaal 10 µm, of 8 coupes, met een dikte van maximaal 5 µm een oppervlakte van maximaal 250 mm ² , worden gebruikt. |
| Naam protocol | Tissue_LC_200_V7_DSP |
| Standaard assaycontroleset | ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP |
| Elutievolume | 50 µl, 100 µl, 200 µl of 400 µl |
| Vereiste softwareversie | Versie 4.0 of hoger |

* Raadpleeg HC-protocol voor informatie over weefselmonsters.

HC-protocol (High content)

| | |
|-----------------------------------|---|
| Kit | QIASymphony DSP DNA Mini Kit (catalogusnr. 937236) |
| Monstermateriaal | Weefsel Het wordt aangeraden om te beginnen met 25 mg monstermateriaal als er geen informatie beschikbaar is over de verwachte opbrengst. Afhankelijk van de uiteindelijke opbrengst, kan de monstergrootte in volgende preparaties worden verhoogd. |
| Naam protocol | Tissue_HC_200_V7_DSP |
| Standaard assaycontroleset | ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP |
| Elutievolume | 100 µl, 200 µl of 400 µl |
| Vereiste softwareversie | Versie 4.0 of hoger |

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Voor alle monstertypes

- Buffer ATL (4 x 50 ml) (cat.nr. 939016)
- Om RNA-inhoud te minimaliseren: DNase-vrije RNase A (stockoplossing van 100 mg/ml)

Voor FFPE-weefsel (xyleen-vrije deparaffinisatie)

- Deparaffinisatieoplossing (cat.nr. 939018)

Voor FFPE-weefsel (deparaffinisatie met xyleen)

- Xyleen (99–100%)
- Ethanol (96–100%)*

De lade 'Sample' (Monsterlade)

| | |
|---------------------------------|--|
| Monstertype | FFPE-weefsel en weefsel |
| Monsterinvoervolume | 220 µl (nodig per monster, per protocol) [†] |
| Verwerkt monstervolume | 200 µl |
| Primaire monsterbuizen | n.v.t. |
| Secondaire monsterbuizen | Raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie. |
| Inzetten | Afhankelijk van het gebruikte type monsterbuis, raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie. |

[†] Voor zowel HC- als LC-protocollen zal het systeem het monster niet herkennen als het monstervolume minder is dan 220 µl, omdat monsterverdracht wordt uitgevoerd zonder vloeistofniveaudetectie. Zorg er daarom voor dat het monsterinvoervolume minstens 220 µl is.

n.v.t. = niet van toepassing.

De lade 'Reagents and Consumables' (Reagentia- en verbruiksartikelenlade)

| | |
|----------------------------|--|
| Positie A1 en/of A2 | Reagenscartridge |
| Positie B1 | n.v.t. |
| Tiprekhouder 1–17 | Disposable filtertips, 200 µl of 1500 µl |

* Gebruik geen gedenatureerde alcohol, aangezien daarin aanvullende stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

Verpakkingsdooshouder 1-4

Verpakkingsdozen met monsterbereidingscartridges of 8 staafhulzen

n.v.t. = niet van toepassing.

De lade 'Waste' (Afvallade)

Verpakkingsdooshouder 1-4

Lege verpakkingsdozen

Afvalzakhouder

Afvalzak

Houder afvalvloeistoffenfles

Lege afvalvloeistoffenfles

De lade 'Eluate' (Eluaatlade)

Elutierek (het gebruik van slot 1, de koelpositie, wordt aangeraden)Raadpleeg www.qiagen.com/goto/dsphandbooks voor meer informatie.

Benodigde plastic artikelen

| Plastic artikelen | Een batch, 24 monsters* | Twee batches, 48 monsters* | Drie batches, 72 monsters* | Vier batches, 96 monsters* |
|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Wegwerpbaar filtertips, 200 µl†‡ | 26 | 50 | 74 | 98 |
| Wegwerpbaar filtertips, 1500 µl†‡ | 72 | 136 | 200 | 264 |
| Monsterbereidingscartridges§ | 21 | 42 | 63 | 84 |
| 8-staafhulzen¶ | 3 | 6 | 9 | 12 |

* Bij gebruik van minder dan 24 monsters per batch zijn minder wegwerpbaar filtertips per run nodig.

† Er zitten 32 filtertips in een filtertiprek.

‡ Het aantal benodigde filtertips is inclusief tips voor 1 voorraadscan per reagenscartridge.

§ Er zitten 28 monsterbereidingscartridges in een verpakkingsdoos.

¶ Er zitten twaalf 8-staafhulzen in een verpakkingsdoos.

Opmerking: De gegeven aantallen filtertips kunnen afwijken van de aantallen die op het aanraakscherm worden weergegeven. Dit is afhankelijk van de instellingen. Wij raden aan om het maximaal mogelijke aantal tips te plaatsen.

Elutievolume

Het elutievolume wordt op het aanraakscherm geselecteerd. Afhankelijk van het monstertype en het DNA-gehalte, kan het uiteindelijke eluatvolume tot 15 µl kleiner zijn dan het geselecteerde volume. Het elutievolume kan variëren. Het wordt daarom aangeraden het werkelijke elutievolume te controleren bij gebruik van een geautomatiseerd assay-setupsysteem dat het elutievolume niet verifieert voorafgaand aan de overdracht. Met lagere elutievolumes stijgt de uiteindelijke DNA-concentratie, maar daalt de opbrengst iets. Het gebruik van een elutievolume dat geschikt is voor de bedoelde vervolgtoepping wordt aangeraden.

Bereiding van monstermateriaal

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (safety data sheets, SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Wat u moet weten voor u begint

- QIASymphony magnetische deeltjes zuiveren RNA en DNA als beiden aanwezig zijn in het monster. Voeg RNase A toe aan het monster tijdens de stap die wordt aangegeven in het betreffende voorbehandelingsprotocol om het RNA-gehalte in het monster te minimaliseren.

Wat u moet doen voor u begint

- Controleer Buffer ATL op wit precipitaat. Incubeer indien nodig 30 minuten op 37 °C en schud af en toe om het precipitaat op te lossen.
- Stel een ThermoMixer® of schudincubator in op de vereiste temperatuur voor de betreffende voorbehandeling.*

Weefsels

Er kan vers of bevroren weefsel worden gebruikt voor DNA-purificatie. DNA-opbrengst en -kwaliteit is afhankelijk van het weefseltype, weefselbron en opslagcondities. Vers weefsel kan in kleine stukjes worden gesneden en voor verwerking worden opgeslagen bij –20 °C of –80 °C. Er wordt normaal gesproken aangeraden om het HC-protocol te gebruiken. Dit levert hogere DNA-

* Zorg ervoor dat de apparaten regelmatig zijn gecontroleerd, onderhouden en gekalibreerd volgens de aanwijzingen van de fabrikant.

opbrengsten op. Het LC-protocol, in combinatie met een elutievolume van 50 µl, wordt alleen aangeraden als er hoge DNA-concentraties nodig zijn voor vervolganalyse. Het wordt aangeraden om te beginnen met 25 mg monstermateriaal als er geen informatie beschikbaar is over de verwachte opbrengst en het HC-protocol en een elutievolume van 200 µl te gebruiken. Afhankelijk van de uiteindelijke opbrengst, kan in volgende preparaties de monstergrootte worden verhoogd of het elutievolume worden verminderd. Het overbelasten van preparaties in combinatie met een klein elutievolume kan leiden tot achtergebleven magnetische deeltjes in het eluaat. Dit kan de DNA-zuiverheid en vervolganalyse in gevaar brengen.

Voorbehandelingsprotocol voor weefsel

1. Breng het weefselmonster over naar een microcentrifugebuis van 2 ml (niet meegeleverd).
2. Voeg 220 µl buffer ATL toe.
3. Voeg 20 µl proteïnase K toe en meng door tegen het buisje te tikken.

Opmerking: Gebruik proteïnase K uit het enzymerek van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Plaat de buis in een ThermoMixer of schudincubator en incubeer bij 56 °C met schuddingen van 900 rpm tot het weefsel volledig gelyseerd is

Opmerking: De lyseertijd varieert afhankelijk van het te verwerken weefseltype. Voor de meeste weefsels is de lysering binnen 3 uur voltooid. Indien de lysering na 3 uur niet is voltooid, zoals blijkt uit de aanwezigheid van onoplosbaar materiaal of zeer viskeuze lysaten, kan de lyseertijd worden verlengd of onoplosbaar materiaal kan worden verwijderd door centrifugatie zoals beschreven in stap 6. Lyseren van de ene op de andere dag is mogelijk en heeft geen invloed op het preparaat.

5. Voeg 4 µl RNase A toe (100 mg/ml) en incubeer 2 minuten bij kamertemperatuur (15–25 °C) alvorens verder te gaan met stap 6 om het RNA-gehalte in het monster te minimaliseren.
6. Homogeniseer het monster door een aantal keer op en neer te pipetteren.

Opmerking: Centrifugeer 1 minuut bij 3000 x g indien er nog steeds deeltjes onoplosbaar materiaal aanwezig zijn.

7. Breng voorzichtig 220 µl van het supernatant over naar monsterbuizen die compatibel zijn met de monsterdrager van de QIASymphony SP.

Raadpleeg voor een volledige lijst van compatibele monsterbuizen

www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Het wordt aangeraden om buizen van 2 ml te gebruiken (bijv. Sarsted® cat.nr. 72.693 of 72.608).

FFPE-weefsel

Standaardprocedures bij fixatie met formaline en inbedden in paraffine leiden altijd tot significante fragmentatie van nucleïnezuren. Let op het volgende om de mate van DNA-fragmentatie te beperken:

- Fixeer weefselmonsters zo snel mogelijk na chirurgische verwijdering in 4–10% formaline
- Gebruik een fixatieduur van 14–24 uur (een langere fixatieduur leidt tot ernstigere DNA-fragmentatie, wat een nadelige invloed kan hebben op de resultaten van vervolganalyse).
- Zorg ervoor dat de monsters grondig gedehydrateerd zijn voordat ze worden ingebed (resten formaline kunnen de digestie door proteïnase K verstoren).

Uitgangsmateriaal voor de DNA-zuivering dient te bestaan uit vers gesneden coupes van FFPE-weefsel. Er kunnen in één preparatie maximaal 4 coupes, elk met een dikte van maximaal 10 µm, of 8 coupes, met een dikte van maximaal 5 µm een oppervlakte van maximaal 250 mm², worden verwerkt. Als er geen informatie beschikbaar is over de aard van het uitgangsmateriaal, is het aan te raden te beginnen met niet meer dan drie coupes in een enkele preparatie. Het kan afhankelijk van de DNA-opbrengst en -zuiverheid mogelijk zijn om maximaal 8 coupes te gebruiken bij volgende preparaties.

Opmerking: De FFPE-weefselprotocollen zijn specifiek ontworpen om slechts een kleine hoeveelheid RNA te zuiveren. Dit leidt tot een verlaagde fotometrische meetwaarde in vergelijking met waarden die worden verkregen met de handmatige QIAamp® DSP DNA FFPE-weefselkit.

Voorbehandelingsprotocol voor FFPE-weefsel

Methode 1: deparaffinisatie met een deparaffinisatieoplossing

1. Snijd met een scalpel een eventuele overmaat aan paraffine van het monsterblok af.
2. Snijd maximaal 4 coupes van 10 µm dikte of maximaal 8 coupes van 5 µm dikte.
Opmerking: Als het oppervlak van het monster was blootgesteld aan de lucht, gooi de eerste 2–3 coupes dan weg.
3. Plaats de coupes onmiddellijk in een Sarstedt-buis van 2 ml (niet meegeleverd, cat.nr. 72.693 of 72.608) die compatibel is met de monsterdrager van de QIASymphony SP.
4. Voeg 200 µl buffer ATL toe aan de coupes.
5. Voeg 20 µl proteïnase K toe.

Opmerking: Gebruik proteïnase K uit het enzymerek van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

- Voeg 160 µl of 320 µl deparaffinisatieoplossing toe (zie onderstaande tabel) en vortex om te mengen.

| Dikte van coupes | Aantal coupes | Volume van deparaffinisatieoplossing |
|------------------|---------------|--------------------------------------|
| 5 µm | 1-4 | 160 µl |
| | 5-8 | 320 µl |
| 10 µm | 1-2 | 160 µl |
| | 3-4 | 320 µl |

- Plaats de buis in een ThermoMixer of schudincubator en incubeer 1 uur bij 56 °C met schuddingen van 1000 rpm tot het weefsel volledig gelyseerd is
Opmerking: De lyseertijd varieert afhankelijk van het te verwerken weefseltype. Voor de meeste weefsels is de lysering binnen 1 uur voltooid. Indien de lysering na 1 uur niet is voltooid, zoals blijkt uit de aanwezigheid van onoplosbaar materiaal, kan de lyseertijd worden verlengt of onoplosbaar materiaal kan worden gepelletiseerd door centrifugatie zoals beschreven in stap 10. Lyseren van de ene op de andere dag is mogelijk en heeft geen invloed op het preparaat.
- Incubeer 1 uur bij 90 °C.
Opmerking: Door de incubatie bij 90 °C in buffer ATL wordt de modificatie van nucleïnezuren door formaldehyde gedeeltelijk ongedaan gemaakt. Langere incubatietijden of hogere incubatietemperaturen kunnen leiden tot gefragmenteerder DNA. Als er slechts één verwarmingsblok wordt gebruikt, zet het monster dan bij kamertemperatuur na de incubatie bij 56 °C tot het verwarmingsblok op 90 °C is gekomen.
- Voeg 2 µl RNase A toe (100 mg/ml) aan de lagere fase en incubeer 2 minuten bij kamertemperatuur alvorens verder te gaan met stap 10 om het RNA-gehalte in het monster te minimaliseren. Laat het monster op kamertemperatuur komen alvorens RNase A toe te voegen.
- Centrifugeer 1 minuut bij kamertemperatuur op maximale snelheid.
- Breng de buizen (met daarin beide fasen) voorzichtig over naar de monsterdrager van de QIASymphony SP.

Methode 2: deparaffinisatie met xyleen

- Snijdt met een scalpel een eventuele overmaat aan paraffine van het monsterblok af.
- Snijdt maximaal 4 coupes van 10 µm dikte of maximaal 8 coupes van 5 µm dikte.
Opmerking: Als het oppervlak van het monster was blootgesteld aan de lucht, gooi de eerste 2-3 coupes dan weg.

3. Plaats de coupes onmiddellijk in een microcentrifugebuis van 1,5 of 2 ml (niet meegeleverd) en voeg 1 ml xyleen toe aan het monster. Doe het dopje dicht en vortex krachtig gedurende 10 seconden.
4. Centrifugeer 2 minuten bij kamertemperatuur op maximale snelheid.
5. Pipetteer het supernatant af. Laat de gehele pellet zitten.
6. Voeg 1 ml ethanol (96–100%) aan de pellet toe en vortex om te mengen.
Opmerking: Het ethanol zorgt voor de extractie van achtergebleven xyleen uit het monster.
7. Centrifugeer 2 minuten bij kamertemperatuur op maximale snelheid.
8. Pipetteer het supernatant af. Laat de gehele pellet zitten.
Opmerking: Verwijder met een dunne pipetpunt eventuele achtergebleven restjes ethanol.
9. Incubeer het geopende buisje 10 minuten op kamertemperatuur (15–25 °C) of tot alle overgebleven ethanol is verdampt.
Opmerking: Incubatie mag worden uitgevoerd bij temperaturen tot maximaal 37 °C.
10. Resuspendeer de pellet in 220 µl buffer ATL.
11. Voeg 20 µl proteïnase K toe en vortex om te mengen.
Opmerking: Gebruik proteïnase K uit het enzymerek van de QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
12. Incubeer gedurende 1 uur bij 56 °C (of tot het monster volledig is gelyseerd).
Opmerking: De lyseertijd varieert afhankelijk van het te verwerken weefseltype. Voor de meeste weefsels is de lysering binnen 1 uur voltooid. Indien de lysering na 1 uur niet is voltooid, zoals blijkt uit de aanwezigheid van onoplosbaar materiaal, kan de lyseertijd worden verlengd of onoplosbaar materiaal kan worden verwijderd door centrifugatie zoals beschreven in stap 16. Lyseren van de ene op de andere dag is mogelijk en heeft geen invloed op het preparaat.
13. Incubeer 1 uur bij 90 °C.
Opmerking: Door de incubatie bij 90 °C in buffer ATL wordt de modificatie van nucleïne-zuren door formaldehyde gedeeltelijk ongedaan gemaakt. Langere incubatietijden of hogere incubatietemperaturen kunnen leiden tot gefragmenteerder DNA. Als er slechts één verwarmingsblok wordt gebruikt, zet het monster dan bij kamertemperatuur na de incubatie bij 56 °C tot het verwarmingsblok op 90 °C is gekomen.
14. Centrifugeer het monster kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.
15. Voeg 2 µl RNase A toe (100 mg/ml) en incubeer 2 minuten bij kamertemperatuur alvorens verder te gaan met stap 16 om het RNA-gehalte in het monster te minimaliseren. Laat het monster op kamertemperatuur komen alvorens RNase A toe te voegen.

16. Breng voorzichtig 220 µl van het lysaat over naar monsterbuizen die compatibel zijn met de monsterdrager van de QIASymphony SP.

Opmerking: Centrifugeer het lysaat, indien dit onverteerd materiaal bevat, 2 minuten op kamertemperatuur op maximale snelheid alvorens de supernatant over te brengen naar monsterbuizen. Raadpleeg voor een volledige lijst van compatibele monsterbuizen www.qiagen.com/goto/dsphanthbooks. Het wordt aangeraden om buizen van 2 ml te gebruiken (bijv. Sarstedt, cat.nr. 72.693 of 72.608).

Revisiegeschiedenis

| Document Revisiegeschiedenis | |
|------------------------------|--|
| R3 12/2017 | Wijziging voor QIASymphony-software versie 5.0 |

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de desbetreffende QIAGEN®-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Gedeponeerde namen, handelsmerken, etc. die in dit document worden gebruikt, ook al zijn deze niet specifiek als zodanig aangeduid, mogen niet worden beschouwd als niet wettelijk beschermd. 12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/shop | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com