

Αύγουστος 2017

Οδηγίες χρήσης RNeasy[®] DSP FFPE Kit (Εγχειρίδιο)



50

Έκδοση 1
Για in vitro διαγνωστική χρήση

IVD Για in vitro διαγνωστική χρήση



REF 73604



R1 MAT QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Γερμανία

1106945EL

Περιεχόμενα

Προβλεπόμενη χρήση	3
Σύνοψη και επεξήγηση	3
Αρχές της διαδικασίας	4
Υλικά που παρέχονται	7
Περιεχόμενα του κιτ	7
Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται	8
Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις	9
Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων	11
Συστατικά του κιτ	11
Σημαντικές σημειώσεις	12
Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων	13
Διαδικασία	15
Πρωτόκολλο: Καθαρισμός συνολικού RNA από τομές ιστών FFPE	16
Έλεγχος ποιότητας	20
Περιορισμοί	20
Σύμβολα	21
Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων.....	23
Παράρτημα: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA	25
Πληροφορίες παραγγελίας	28

Προβλεπόμενη χρήση

Το RNeasy DSP FFPE Kit είναι ένα σύστημα που προορίζεται για τον καθαρισμό ολικού RNA από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE).

Το προϊόν προορίζεται για χρήση από επαγγελματίες, όπως τεχνολόγους και ιατρούς που έχουν εκπαιδευθεί σε τεχνικές μοριακής βιολογίας.

Χρησιμοποιεί ένα βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο που βασίζεται σε στήλη φυγοκέντρισης από πυρίτιο και περιλαμβάνει ενζυμική αφαίρεση του υπολειπόμενου DNA.

Το RNeasy DSP FFPE Kit προορίζεται για in vitro διαγνωστική χρήση

Σύνοψη και επεξήγηση

Το RNeasy DSP FFPE Kit είναι ειδικά σχεδιασμένο για τον καθαρισμό ολικού RNA από τομές ιστών μονιμοποιημένων σε φορμόλη και εγκλεισμένων σε παραφίνη (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE). Με την απομόνωση μορίων RNA μήκους άνω των 70 νουκλεοτιδίων, το kit παρέχει ανάκτηση χρησιμοποιήσιμων τμημάτων RNA για εφαρμογές όπως RT-PCR.

Λόγω των συνθηκών μονιμοποίησης και εγκλεισμού, τα νουκλεϊκά οξέα στα δείγματα FFPE είναι συνήθως κατακερματισμένα και χημικά τροποποιημένα από τη φορμαλδεΐδη. Συνεπώς, τα νουκλεϊκά οξέα που απομονώνονται από δείγματα FFPE έχουν συχνά χαμηλότερο μοριακό βάρος από αυτά που λαμβάνονται από φρέσκα ή κατεψυγμένα δείγματα. Ο βαθμός κατακερματισμού εξαρτάται από τον τύπο και την ηλικία του δείγματος, καθώς και από τις συνθήκες για τη μονιμοποίηση, τον εγκλεισμό και τη φύλαξη του δείγματος. Για την τυποποίηση των διαδικασιών προ της εξέτασης για ιστό FFPE, συνιστούμε ενέργειες σύμφωνα με το πρότυπο CEN, CEN/TS 16827-1_2015.

Παρόλο που η τροποποίηση από τη φορμαλδεΰδη δεν μπορεί να ανιχνευτεί σε τυπικούς προσδιορισμούς ελέγχου ποιότητας, όπως ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ή ανάλυση με μικροεργαστήριο σε ψηφίδα (lab-on-a-chip), δεν επηρεάζει ισχυρά τις ενζυμικές αναλύσεις.

Παρόλο που το RNeasy DSP FFPE Kit είναι βελτιστοποιημένο ώστε να αναστρέφει την τροποποίηση από τη φορμαλδεΰδη κατά τον μεγαλύτερο δυνατό βαθμό, χωρίς περαιτέρω υποβάθμιση του RNA, τα νουκλεϊκά οξέα που καθαρίζονται από τα δείγματα FFPE δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε καθοδικές (downstream) εφαρμογές που απαιτούν RNA πλήρους μήκους. Ορισμένες εφαρμογές μπορεί να απαιτούν τροποποιήσεις ώστε να είναι δυνατή η χρήση κατακερματισμένου RNA (π.χ., σχεδιασμός μικρών αμπλικονίων για RT-PCR). Για τη σύνθεση cDNA, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τυχαίοι ή ειδικοί γονιδιακά εκκινητές, αντί για εκκινητές oligo-dT.

Η χρώση τομών FFPE μπορεί επίσης να επηρεάσει την ποιότητα του RNA και την απόδοση σε καθοδικές εφαρμογές. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για πολλά πρωτόκολλα ανοσοϊστοχημικής χρώσης

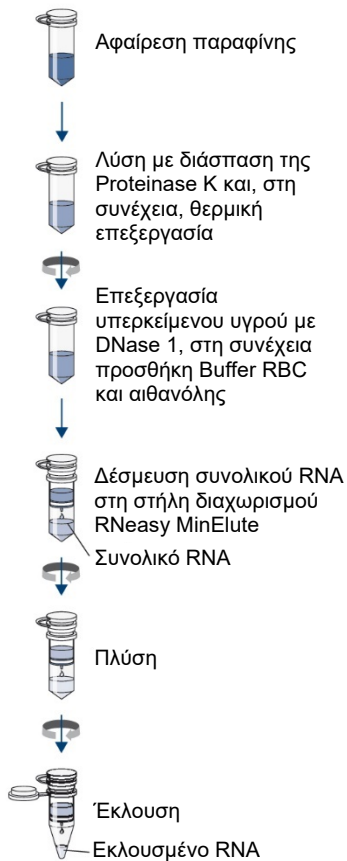
Αρχές της διαδικασίας

Η διαδικασία RNeasy DSP FFPE χρησιμοποιεί ευρέως καθιερωμένη τεχνολογία RNeasy για τον καθαρισμό RNA. Οι ειδικά βελτιστοποιημένες συνθήκες λύσης επιτρέπουν τον αποτελεσματικό καθαρισμό του συνολικού RNA από τις τομές ιστών FFPE. Το βήμα διάσπασης του DNase I αφαιρεί αποτελεσματικά τη μόλυνση DNA, συμπεριλαμβανομένων των μορίων με υψηλό κατακερματισμό.

Πρώτα, όλη η παραφίνη αφαιρείται από τις φρέσκες τομές ιστού FFPE μέσω επεξεργασίας με Deparaffinization Solution. Στη συνέχεια, τα δείγματα επωάζονται σε ένα βελτιστοποιημένο διάλυμα λύσης, το οποίο περιέχει Proteinase K για την απελευθέρωση του RNA από τις τομές. Μια σύντομη επώαση σε υψηλότερη θερμοκρασία αναστρέφει μερικώς τη διασταυρούμενη σύνδεση των απελευθερωμένων νουκλεϊκών οξέων που προκαλείται από τη φορμόλη, βελτιώνοντας την παραγωγή και την ποιότητα του RNA, καθώς και την απόδοση του RNA σε καθοδικούς ενζυμικούς προσδιορισμούς. Αυτό ακολουθείται από επεξεργασία με DNase I, το οποίο είναι βελτιστοποιημένο για την εξάλειψη του γονιδιωματικού DNA, συμπεριλαμβανομένων πολύ μικρών τμημάτων DNA που υπάρχουν συχνά σε δείγματα FFPE μετά από παρατεταμένη μονιμοποίηση σε φορμόλη ή/και μακρούς χρόνους φύλαξης. Στη συνέχεια, το προϊόν λύσης αναμειγνύεται με Buffer RBC. Προστίθεται αιθανόλη για την εξασφάλιση κατάλληλων συνθηκών δέσμευσης για το RNA, και το δείγμα εφαρμόζεται στη συνέχεια σε μια στήλη διαχωρισμού RNeasy MinElute, όπου το συνολικό RNA δεσμεύεται στη μεμβράνη και οι επιμολυντές εκπλένονται αποτελεσματικά. Στη συνέχεια, το RNA εκλύεται σε τουλάχιστον 14 μl νερού ελεύθερου RNασών.

Διαδικασία RNeasy DSP FFPE

Τομές ιστών FFPE



Εικόνα 1. Διαδικασία καθαρισμού RNA από ιστό FFPE με χρήση του RNeasy DSP FFPE Kit.

Υλικά που παρέχονται

Περιεχόμενα του KIT

RNeasy DSP FFPE Kit			(50)
Αρ. καταλόγου			73604
Αριθμός παρασκευών			50
	Αναγνωριστικό	Σύμβολα	Ποσότητα
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (Στήλες διαχωρισμού) (ροζ) (έκαστη σε σωληνάριο συλλογής των 2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Σωληνάρια έκλουσης) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Σωληνάρια λύσης) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Σωληνάρια πλύσης) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution (Διάλυμα αποπαραφίνωσης)	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC (Ρυθμιστικό διάλυμα RBC)*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD (Ρυθμιστικό διάλυμα PKD)	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (DNάση ελεύθερη RNασών I) (λυσφιλοποιημένο)	DNase	1
RNFW	RNase-free Water (Νερό ελεύθερο RNασών)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer (Ενισχυτικό ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης)	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE (Ρυθμιστικό διάλυμα RPE) [†] (συμπυκνωμένο)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v1	Εγχειρίδιο RNeasy DSP FFPE Kit		1

* Περιέχει ένα άλας γουανιδίνης. Μη συμβατό με απολυμαντικά που περιέχουν χλώριο. Βλ. σελίδα 9 για πληροφορίες ασφάλειας.

[†] Προτού το χρησιμοποιήσετε για πρώτη φορά, προσθέστε 4 όγκους αιθανόλης (96–100%, μη αποδιαταγμένο) όπως αναγράφεται στη φιάλη και περιγράφεται στη σελίδα 13, για να παρασκευάσετε το διάλυμα εργασίας.

Υλικά που απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, παρακαλούμε ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheet, SDS), τα οποία και είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

Βεβαιωθείτε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί και βαθμονομηθεί σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή.

- Στείρα ρύγχη πιπέτας και πιπέτες ελεύθερα RNAσών
- Μικροφυγόκεντρος (με στροφέα για σωληνάρια των 2 ml)
- Αναδευτήρας
- 100% αιθανόλη (μη χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη, η οποία περιέχει άλλες ουσίες, όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη)
- Γάντια μίας χρήσης
- Θερμικό μπλοκ με λειτουργία ανακίνησης και δυνατότητα επώασης σε θερμοκρασία 56°C και 80°C

Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις

Για in vitro διαγνωστική χρήση.

Διαβάστε όλες τις οδηγίες προσεκτικά προτού χρησιμοποιήσετε το κιτ.

Κατά την εργασία με χημικές ουσίες, φοράτε πάντα κατάλληλη προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (Safety Data Sheet, SDS). Αυτά τα δελτία είναι διαθέσιμα online σε μορφή PDF στη διεύθυνση www.qiagen.com/safety όπου μπορείτε να βρείτε να προβάλετε και να εκτυπώσετε τα δελτία SDS για κάθε κιτ και συστατικό των κιτ της QIAGEN.

ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ Κίνδυνος τραυματισμού



ΜΗΝ προσθέτετε λευκαντικά ή όξινα διαλύματα απευθείας στα απόβλητα παρασκευής δειγμάτων.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα στο RNeasy DSP FFPE Kit περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Εάν χυθεί ρυθμιστικό διάλυμα από το κιτ, καθαρίστε με κατάλληλο απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό. Εάν το υγρό που χύθηκε περιέχει δυνητικά μολυσματικούς παράγοντες, καθαρίστε καταρχάς την προσβεβλημένη περιοχή με απορρυπαντικό εργαστηρίου και νερό και κατόπιν με υποχλωριώδες νάτριο συγκέντρωσης 1% (v/v).

Οι ακόλουθες δηλώσεις κινδύνου και προφύλαξης ισχύουν για τα συστατικά του RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNF, DBB

Περιέχει: Αζίδιο του νατρίου. Προειδοποίηση! Μπορεί να είναι επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό εάν αισθανθείτε αδιαθεσία.

DSP



Περιέχει: εξαδεκάνιο. Κίνδυνος! Μπορεί να προκαλέσει θάνατο σε περίπτωση κατάποσης και διείσδυσης στις αναπνευστικές οδούς. Παρατεταμένη έκθεση μπορεί να προκαλέσει ζηρήματα δέρματος ή σκάσιμο. Διαθέστε τα περιεχόμενα/περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων. ΜΗΝ προκαλέσετε εμετό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Καλέστε αμέσως το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. Φυλάσσεται κλειδωμένο.

Proteinase K



Περιέχει: Proteinase K. Κίνδυνος! Προκαλεί ήπιο ερεθισμό του δέρματος. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα. Διαθέστε τα περιεχόμενα/περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων. Εάν παρουσιάζονται αναπνευστικά συμπτώματα: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Εάν ο παθών έχει δύσπνοια, μεταφέρετέ τον στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής.

DNase I



Περιέχει: Δεσοξυριβονουκλεάση. Κίνδυνος! Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργία ή συμπτώματα άσθματος ή δύσπνοια σε περίπτωση εισπνοής. Αποφεύγετε να αναπνέετε σκόνη/αναθυμιάσεις/αέρια/σταγονίδια/ατμούς/εκνεφώματα. Διαθέστε τα περιεχόμενα/περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων. Εάν παρουσιάζονται αναπνευστικά συμπτώματα: Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΙΣΠΝΟΗΣ: Εάν ο παθών έχει δύσπνοια, μεταφέρετέ τον στον καθαρό αέρα και αφήστε τον να ξεκουραστεί σε στάση που διευκολύνει την αναπνοή. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο. Να φοράτε μέσα ατομικής προστασίας της αναπνοής.

RBC



Περιέχει: υδροχλωρική γουανιδίνη. Προειδοποίηση! Επιβλαβές σε περίπτωση κατάποσης ή σε περίπτωση εισπνοής. Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Καλέστε το ΚΕΝΤΡΟ ΔΗΛΗΤΗΡΙΑΣΕΩΝ ή έναν γιατρό εάν αισθανθείτε αδιαθεσία. Διαθέστε τα περιεχόμενα/περιέκτη σε εγκεκριμένη μονάδα διάθεσης αποβλήτων. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

DBB



Περιέχει: χλωριούχο ασβέστιο, χλωριούχο υδρογόνο. Προειδοποίηση! Προκαλεί ερεθισμό του δέρματος. Προκαλεί σοβαρό οφθαλμικό ερεθισμό. Εάν δεν υποχωρεί ο οφθαλμικός ερεθισμός: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλύνετε. Βγάλτε τα μολυσμένα ρούχα και πλύντε τα πριν τα επαναχρησιμοποιήσετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος: Συμβουλευθείτε/Επισκεφθείτε γιατρό. Να φοράτε προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/μέσα ατομικής προστασίας για τα μάτια/πρόσωπο.

Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων

Το RNase-Free DNase I και οι στήλες RNeasy MinElute Spin Columns θα πρέπει να φυλάσσονται στους 2–8°C αμέσως μετά την παραλαβή. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μπορούν να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Υπό αυτές τις συνθήκες, το κιτ μπορεί να φυλάσσεται έως την ημερομηνία λήξης στην ετικέτα του κουτιού, χωρίς υποβάθμιση της απόδοσης.

Μην χρησιμοποιείτε το RNeasy DSP FFPE Kit μετά την ημερομηνία λήξης.

Συστατικά του κιτ

Οι ημερομηνίες λήξης για κάθε αντιδραστήριο υποδεικνύονται στις ετικέτες των επιμέρους συστατικών. Στις σωστές συνθήκες φύλαξης, το προϊόν διατηρεί την απόδοση ως προς το χρόνο σταθερότητας, εφόσον χρησιμοποιούνται οι ίδιες παρτίδες των συστατικών.

Για μακροπρόθεσμη φύλαξη του DNase I μετά την ανασύσταση, αφαιρέστε το αρχικό διάλυμα από το φιαλίδιο, διαιρέστε το σε υποπολλαπλάσια μίας χρήσης και φυλάξτε στους –15 έως –30°C για μέχρι 9 μήνες. Υποπολλαπλάσια που έχουν αποψυχθεί μπορούν να διατηρηθούν στους 2–8°C για μέχρι 6 εβδομάδες. Μην καταψύχετε εκ νέου τις ήδη αποψυγμένες ποσότητες.

Αποφύγετε την έκθεση των αντιδραστηρίων σε υπεριώδες φως (που χρησιμοποιείται π.χ. στην απολύμανση) διότι μπορεί να επισπεύσει τη φθορά.

Σημαντικές σημειώσεις

Αρχικό υλικό

Οι τυπικές διαδικασίες μονιμοποίησης σε φορμόλη και εγκλεισμού σε παραφίνη οδηγούν πάντοτε σε σημαντικό κατακερματισμό και διασταυρούμενη σύνδεση νουκλεϊκών οξέων. Για να περιορίσετε την έκταση του κατακερματισμού και της διασταυρούμενης σύνδεσης των νουκλεϊκών οξέων, διασφαλίστε τα εξής:

- Χρησιμοποιείτε δείγματα ιστού πάχους κάτω των 5 mm, ώστε να είναι δυνατή η πλήρης διείσδυση της φορμόλης
- Μονιμοποιείτε τα δείγματα ιστού σε ουδέτερο ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 4–10% το συντομότερο δυνατό μετά τη χειρουργική αφαίρεση
- Εφαρμόστε μέγιστο χρόνο μονιμοποίησης 24 ωρών (οι μεγαλύτεροι χρόνοι μονιμοποίησης οδηγούν σε υπερβολική μονιμοποίηση και επιδεινώνουν τον κατακερματισμό των νουκλεϊκών οξέων, με αποτέλεσμα ανεπαρκή απόδοση σε καθοδικούς προσδιορισμούς)
- Αφυδατώνετε σχολαστικά τα δείγματα πριν από τον εγκλεισμό
- Χρησιμοποιείτε παραφίνη χαμηλού σημείου τήξης για τον εγκλεισμό

Το αρχικό υλικό για τον καθαρισμό του RNA θα πρέπει να είναι πρόσφατες τομές ιστού FFPE, πάχους έως 20 μm έκαστη. Οι τομές μεγαλύτερου πάχους μπορεί να οδηγήσουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις νουκλεϊκών οξέων, ακόμη και μετά από παρατεταμένη επώαση με Proteinase K. Σε μία προετοιμασία μπορούν να συνδυαστούν έως και 4 τομές, πάχους έως 10 μm έκαστη. Μπορούν να συνδυαστούν περισσότερες από 4 τομές εάν το συνολικό άθροισμα του πάχους των τομών είναι 40 μm ή μικρότερο (π.χ. οκτώ τομές πάχους 5 μm).

Για ιστούς με ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε DNA συνιστούμε τη χρήση λιγότερων τομών ανά προετοιμασία για την αποφυγή της μόλυνσης DNA του απομονωμένου RNA.

Εάν δεν υπάρχουν πληροφορίες σχετικά με τη φύση του αρχικού υλικού, συνιστούμε να ξεκινήσετε χρησιμοποιώντας όχι περισσότερες από 2 τομές ανά προετοιμασία. Ανάλογα με την απόδοση και την καθαρότητα του RNA, ενδεχομένως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως και 4 τομές στις επόμενες προετοιμασίες. Ωστόσο, η υπερφόρτωση της στήλης διαχωρισμού RNeasy MinElute μπορεί να μειώσει σημαντικά την απόδοση και την ποιότητα του RNA.

Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων

Προετοιμασία αρχικού διαλύματος DNase I

Προετοιμάστε αρχικό διάλυμα DNase I διαλύοντας το λυοφιλοποιημένο DNase I σε 550 μl νερού ελεύθερου RNAσών. Για την αποφυγή της απώλειας DNase I, μην ανοίγετε το φιαλίδιο. Πραγματοποιήστε έγχυση του νερού ελεύθερου RNAσών στο φιαλίδιο χρησιμοποιώντας βελόνα και σύριγγα χωρίς RNAσες. Αναμείξτε ήπια αναστρέφοντας το φιαλίδιο. Μην χρησιμοποιείτε αναδευτήρα vortex για την ανάμειξη.

Σε μερικές περιπτώσεις, το φιαλίδιο DNase I μπορεί να φαίνεται κενό. Αυτό οφείλεται στην προσκόλληση του λυοφιλοποιημένου ενζύμου στη μεμβράνη. Για την αποφυγή της απώλειας DNase I, μην ανοίγετε το φιαλίδιο. Αντίθετα, διαλύστε το DNase I χρησιμοποιώντας βελόνα και σύριγγα όπως περιγράφεται παρακάτω.

Σημείωση: Το DNase I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά μόνο με ήπια αναστροφή του φιαλιδίου.

Σημείωση: Φροντίστε να εγχυθεί ολόκληρος ο όγκος του νερού ελεύθερου RNAσών στο φιαλίδιο.

Μετά τη διάλυση του DNase I μπορεί να απομείνει αδιάλυτο υλικό. Λόγω της διαδικασίας παραγωγής, μπορεί να υπάρχει στο λυοφιλοποιημένο DNase I αδιάλυτο υλικό. Αυτό δεν επηρεάζει την απόδοση του DNase I.

Για μακροπρόθεσμη φύλαξη του DNase I, αφαιρέστε το αρχικό διάλυμα από το φιαλίδιο, διαιρέστε το σε υποπολλαπλάσια μίας χρήσης και φυλάξτε στους -15 έως -30°C για μέχρι 9 μήνες. Υποπολλαπλάσια που έχουν αποψυχθεί μπορούν να διατηρηθούν στους $2-8^{\circ}\text{C}$ για μέχρι 6 εβδομάδες. Μην καταψύχετε εκ νέου τις ήδη αποψυγμένες ποσότητες.

Προετοιμασία Buffer RPE

Προσθέστε 4 όγκους (44 ml) αιθανόλης (96–100%) στη φιάλη που περιέχει 11 ml συμπυκνωμένου Buffer RPE. Σημειώστε το πλαίσιο ελέγχου στην ετικέτα του φιαλιδίου, για να δείξετε πως έχει προστεθεί αιθανόλη.

Σημείωση: Πριν ξεκινήσετε τη διαδικασία, αναμείξτε το ανασυσταμένο Buffer RPE με ανακίνηση.

Διαδικασία

Σημαντικές υποδείξεις πριν από την έναρξη

- Εάν χρησιμοποιείτε το RNeasy DSP FFPE Kit για πρώτη φορά, διαβάστε τις «Σημαντικές σημειώσεις» (σελίδα 12)
- Εάν εργάζεστε με RNA για πρώτη φορά, διαβάστε το «Παράρτημα: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA» (σελίδα 25).
- Το Buffer RBC περιέχει άλας γουανιδίνης και συνεπώς δεν είναι συμβατό με αντιδραστήρια απολύμανσης που περιέχουν λευκαντικό. Βλ. σελίδα 9 για πληροφορίες ασφάλειας.
- Εάν δεν υποδεικνύεται διαφορετικά, πραγματοποιήστε όλα τα βήματα της διαδικασίας σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, να εργάζεστε γρήγορα. Μην κάνετε ενδιάμεσες διακοπές.
- Εκτελέστε όλα τα βήματα φυγοκέντρησης χρησιμοποιώντας μια μικροφυγόκεντρο στους 15–25°C. Εάν χρησιμοποιείτε ψυχόμενη μικροφυγόκεντρο, ρυθμίστε τη θερμοκρασία στους 20–25°C, διαφορετικά μπορεί να προκύψει σημαντική ψύξη κάτω των 15°C.
- Στην παρακάτω διαδικασία, το ▲ υποδεικνύει τους όγκους προς χρήση εάν υποβάλλονται σε επεξεργασία 1–2 τομές ανά δείγμα, ενώ το ● υποδεικνύει τους όγκους προς χρήση εάν υποβάλλονται σε επεξεργασία >3–4 τομές ανά δείγμα.
- Εάν χρησιμοποιείτε τα Buffer RPE και RNase-Free DNase I για πρώτη φορά, ανασυστήστε τα όπως περιγράφεται στην ενότητα «Προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων» (σελίδα 13)
- Αφήστε όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου (15–25°C). Αναμείξτε το ανασυσταμένο Buffer RPE με ανακίνηση.
- Ρυθμίστε έναν θερμικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία 56°C για χρήση στο βήμα 5 και στο βήμα 9. Για να μειώσετε τον χρόνο αναμονής, ρυθμίστε έναν δεύτερο θερμικό αναδευτήρα στους 80°C για χρήση στο βήμα 9.

- **Σημείωση:** Μην διακόπτετε τη διαδικασία καθαρισμού στο ενδιάμεσο, καθώς οι αυξημένοι χρόνοι επώασης μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια ή υποβάθμιση του RNA. Ο μέσος χρόνος επεξεργασίας έως και 12 δειγμάτων παράλληλα είναι περίπου 130 λεπτά.

Πρωτόκολλο: Καθαρισμός συνολικού RNA από τομές ιστών FFPE

1. Χρησιμοποιώντας ένα νυστέρι, αποκόψτε την περίσσεια παραφίνης από το μπλοκ του δείγματος.
2. Κόψτε τομές πάχους 5–20 μm.
Εάν η επιφάνεια του δείγματος έχει εκτεθεί στον αέρα, απορρίψτε τις πρώτες 2–3 τομές.
3. Τοποθετήστε αμέσως τις τομές σε ένα σωληνάριο μικροφυγόκεντρου ▲ 1,5 ml ή ● 2 ml και κλείστε το καπάκι.
4. Προσθέστε ▲ 160 μl ή ● 320 μl Deparaffinization Solution, στροβιλίστε έντονα για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρίστε σύντομα για να φέρετε το δείγμα στον πυθμένα του σωληναρίου.
5. Επωάστε στους 56°C για 3 λεπτά και στη συνέχεια αφήστε το υλικό να κρυώσει για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
Εάν χρησιμοποιηθεί πολύ μικρή ποσότητα Deparaffinization Solution ή μεταφερθεί πολύ μεγάλη ποσότητα παραφίνης με το δείγμα, το Deparaffinization Solution μπορεί να γίνει κηρώδες ή στερεό μετά την ψύξη. Εάν συμβεί αυτό, προσθέστε επιπλέον Deparaffinization Solution σε βήματα των 160 μl και επαναλάβετε το βήμα 5.
6. Προσθέστε ▲ 150 μl ή ● 240 μl Buffer PKD και αναμειξτε με στροβιλισμό για 3 δευτερόλεπτα.
7. Φυγοκεντρίστε για 1 λεπτό σε 11.000 x g.
8. Προσθέστε 10 μl Proteinase K στην κατώτερη, διαυγή φάση και αναμειξτε ήπια με πιπέτα 10 φορές, πάνω και κάτω (μην αναμειγνύετε διαχωρισμένες φάσεις).

9. Επωάστε στους 56°C για 15 λεπτά στις 1.100 και, στη συνέχεια, στους 80°C για 15 λεπτά στις 1.100 rpm.

Εάν χρησιμοποιείτε μόνο ένα θερμικό μπλοκ, αφήστε το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου μετά την επώαση στους 56°C, ώσπου το θερμικό μπλοκ να φτάσει στους 80°C.

Σημείωση: Για τη μέγιστη απόδοση RNA δεν απαιτείται πλήρης διάσπαση του ιστού από την Proteinase K. Ωστόσο, το βήμα επώασης στους 80°C είναι κρίσιμης σημασίας.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: Βεβαιωθείτε ότι το θερμικό μπλοκ έχει φτάσει στους 80°C πριν από την έναρξη της επώασης για 15 λεπτά. Η επώαση 15 λεπτών στους 80°C είναι κρίσιμης σημασίας για την αναστροφή των διασταυρούμενων συνδέσεων της φορμαλδεΐδης και τη βέλτιστη απόδοση του RNA φορμαλδεΐδη σε καθοδικές εφαρμογές, όπως η real-time RT-PCR.

10. Φυγοκεντρίστε σύντομα και μεταφέρετε ▲ 145 μl ή ● 230 μl από την κατώτερη, άχρωμη φάση σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγόκεντρου 1,5 ml.
11. Επωάστε σε πάγο για 3 λεπτά. Στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε για 15 λεπτά σε 20.000 x g.
12. Μεταφέρετε το υπερκείμενο υγρό σε ένα νέο σωληνάριο μικροφυγόκεντρου 2 ml, προσέχοντας να μην αναταράξετε το συσσωμάτωμα.

Το συσσωμάτωμα περιέχει αδιάλυτα υπολείμματα ιστού, συμπεριλαμβανομένου διασταυρούμενου DNA.

13. Προσθέστε DNase Booster Buffer ισοδύναμο με το ένα δέκατο του συνολικού όγκου του δείγματος (▲ 14,5 μl ή ● 23 μl) και 10 μl αρχικού διαλύματος DNase I. Αναμείξτε αναστρέφοντας το σωληνάριο. Φυγοκεντρίστε σύντομα για να συγκεντρωθεί το υπολειπόμενο υγρό από τα τοιχώματα του σωληναρίου.

Σημείωση: Το DNase I παρέχεται λυοφιλοποιημένο και θα πρέπει να ανασυστήνεται όπως περιγράφεται στην ενότητα «Προετοιμασία αρχικού διαλύματος DNase I». Σελίδα 13.

Σημείωση: Το DNase I είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο στη φυσική μετουσίωση. Αναμείξτε προσεκτικά μόνο με ήπια αναστροφή του σωληναρίου. Μην χρησιμοποιείτε αναδευτήρα vortex για την ανάμιξη.

14. Επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου επί 15 λεπτά.

15. Προσθέστε ▲ 320 μl ή ● 500 μl Buffer RBC για να ρυθμίσετε τις συνθήκες δέσμευσης και αναμείξτε το προϊόν λύσης σχολαστικά στροβιλίζοντας για 3 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια, φυγοκεντρίστε σύντομα.
16. Προσθέστε ▲ 720 μl ή ● 1200 μl αιθανόλης (100%) στο δείγμα. Μην φυγοκεντρίσετε. Προχωρήστε αμέσως στο βήμα 17.
Μετά την προσθήκη αιθανόλης, μπορεί να υπάρχουν ορατά ιζήματα. Αυτό δεν επηρεάζει τη διαδικασία.
17. Αναμείξτε καλά με πιπέτα 5 φορές επάνω και κάτω, και μεταφέρετε 700 μl του δείγματος, συμπεριλαμβανομένου τυχόν ιζήματος που μπορεί να έχει σχηματιστεί, σε μια στήλη φυγοκέντρησης RNeasy MinElute τοποθετημένη σε σωληνάριο συλλογής 2 ml. Κλείστε το καπάκι προσεκτικά και φυγοκεντρίστε για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8.000 \times g$. Απορρίψτε το σωληνάριο συλλογής με το διελθόν υγρό* και τοποθετήστε τη στήλη σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής (παρέχεται).
18. Επαναλάβετε το βήμα 17 (χωρίς επιπλέον ανάμειξη) έως ότου όλο το δείγμα περάσει από τη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy MinElute.
19. Προσθέστε 500 μl Buffer RPE στη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy MinElute. Κλείστε το καπάκι προσεκτικά και φυγοκεντρίστε για 15 δευτερόλεπτα σε $\geq 8.000 \times g$. Απορρίψτε το σωληνάριο συλλογής με το διελθόν υγρό* και τοποθετήστε τη στήλη σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής (παρέχεται).

Σημείωση: Το Buffer RPE παρέχεται υπό μορφή πυκνού διαλύματος. Βεβαιωθείτε ότι η αιθανόλη προστίθεται πριν από τη χρήση, όπως περιγράφεται στην ενότητα «Προετοιμασία Buffer RPE».

* Το διελθόν υγρό περιέχει Buffer RBC και συνεπώς δεν είναι συμβατό με λευκαντικό. Βλ. σελίδα 8 για πληροφορίες ασφάλειας.

20. Προσθέστε 500 μl Buffer RPE στη στήλη φυγοκέντρισης RNeasy MinElute. Κλείστε το καπάκι προσεκτικά και φυγοκεντρίστε για 2 λεπτά στα $\geq 8.000 \times g$ για να εκπλυθεί η μεμβράνη της στήλης φυγοκέντρισης. Απορρίψτε το σωληνάριο συλλογής με το διελθόν υγρό* και τοποθετήστε τη στήλη σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής (παρέχεται).

Σημείωση: Μετά τη φυγοκέντριση, αφαιρέστε προσεκτικά τη στήλη φυγοκέντρισης RNeasy MinElute από το σωληνάριο συλλογής έτσι ώστε η στήλη να μην έρθει σε επαφή με το διελθόν υγρό. Διαφορετικά θα προκύψει επιμόλυνση με αιθανόλη στη στήλη.

21. Ανοίξτε το καπάκι της στήλης φυγοκέντρισης και φυγοκεντρίστε στη μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά. Απορρίψτε το σωληνάριο συλλογής που περιέχει το διελθόν υγρό.

Για την αποφυγή ζημιάς στα καπάκια των στηλών φυγοκέντρισης, τοποθετήστε τις στήλες μέσα στη φυγόκεντρο έτσι ώστε να υπάρχει τουλάχιστον μία κενή θέση ανάμεσά τους. Στρέψτε τα καπάκια προς κατεύθυνση αντίθετη από την κατεύθυνση περιστροφής του ρότορα (π.χ. εάν ο ρότορας περιστρέφεται προς τα δεξιά, στρέψτε τα καπάκια προς τα αριστερά).

Είναι σημαντικό να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης φυγοκέντρισης επειδή τα υπολείμματα αιθανόλης μπορούν να επηρεάσουν τις περαιτέρω αντιδράσεις. Με τη φυγοκέντριση με ανοικτό καπάκι εξασφαλίζεται ότι δεν θα μεταφερθεί αιθανόλη κατά την έκλυση του RNA.

22. Τοποθετήστε τη στήλη φυγοκέντρισης RNeasy MinElute σε νέο σωληνάριο συλλογής των 1,5 ml (παρέχεται). Προσθέστε 14–32 μl νερό ελεύθερο RNAσών ακριβώς στο κέντρο της μεμβράνης της στήλης φυγοκέντρισης. Κλείστε το καπάκι προσεκτικά και φυγοκεντρίστε επί 1 λεπτό στη μέγιστη ταχύτητα για να εκλυστεί το RNA.

Η έκλυση με μικρότερους όγκους νερού ελεύθερου RNAσών οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις RNA, αλλά χαμηλότερες αποδόσεις RNA.

* Το διελθόν υγρό περιέχει Buffer RBC και συνεπώς δεν είναι συμβατό με λευκαντικό. Βλ. σελίδα 9 για πληροφορίες ασφάλειας.

Σημείωση: Για αναμενόμενες χαμηλές αποδόσεις RNA, συνιστάται σωληνάριο χαμηλής δέσμευσης για την έκλουση (δεν παρέχεται). Ο μέρος νεκρός όγκος της στήλης φυγοκέντρησης RNeasy MinElute είναι 2 μl: η έκλουση με 14 μl νερού ελεύθερου RNAsών οδηγεί σε έκλουσμα περίπου 12 μl.

23. Φυλάσσετε τα εκλούσματα RNA σε θερμοκρασία -60 έως -90°C ή -15 έως -30°C για έως και 8 εβδομάδες.

Έλεγχος ποιότητας

Σύμφωνα με το πιστοποιημένο κατά ISO Σύστημα Διαχείρισης Ποιότητας της QIAGEN, κάθε παρτίδα του RNeasy DSP FFPE Kit έχει ελεγχθεί σε ό,τι αφορά τις προκαθορισμένες προδιαγραφές για τη διασφάλιση σταθερής ποιότητας των προϊόντων

Περιορισμοί

Η απόδοση του συστήματος έχει τεκμηριωθεί σε μελέτες αξιολόγησης της απόδοσης στον καθαρισμό ανθρώπινου RNA από δείγματα μονιμοποιημένα σε φορμόλη και εγκλεισμένα σε παραφίνη.

Η επαλήθευση της απόδοσης του συστήματος για οποιεσδήποτε διαδικασίες που εφαρμόζονται στο εκάστοτε εργαστήριο και δεν καλύπτονται από τις μελέτες αξιολόγησης της απόδοσης της QIAGEN αποτελούν ευθύνη του χρήστη.

Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου αρνητικής επίδρασης στα διαγνωστικά αποτελέσματα, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλοι μάρτυρες για καθοδικές εφαρμογές.

Οποιαδήποτε διαγνωστικά αποτελέσματα προκύπτουν πρέπει να ερμηνεύονται σε συνδυασμό με άλλα κλινικά ή εργαστηριακά ευρήματα.

Σύμβολα

Σε αυτές τις οδηγίες χρήσης περιλαμβάνονται τα σύμβολα του ακόλουθου πίνακα.



<N>

Περιέχει αντιδραστήρια που επαρκούν για <N> αντιδράσεις



Ημερομηνία λήξης



In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν



Κατά την παραλαβή



DN



RNeasy MinElute Spin



Αριθμός καταλόγου



Αριθμός παρτίδας



Αριθμός υλικού (δηλ. επισήμανση στοιχείου)



Στοιχεία (δηλ. κατάλογος περιεχομένων)

CONT

Περιεχόμενο (περιεχόμενα)

NUM

Αριθμός (δηλ. φιαλιδίων, φιαλών)

GTIN

Διεθνής κωδικός μονάδων εμπορίας

Rn

Το R αφορά στην αναθεώρηση των οδηγιών χρήσης (εγχειρίδιο) και το n είναι ο αριθμός αναθεώρησης



Περιορισμός θερμοκρασίας



Κατασκευαστής



Συμβουλευθείτε τις οδηγίες χρήσης



Προσοχή

PROTK

Proteinase K

Sodium azide

Αζίδιο του νατρίου

Οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων

Αυτός ο οδηγός αντιμετώπισης προβλημάτων μπορεί να σας βοηθήσει στην επίλυση ενδεχόμενων προβλημάτων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε και στη σελίδα Frequently Asked Questions (Συχνές ερωτήσεις) του Κέντρου Τεχνικής Υποστήριξης της εταιρείας μας: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Οι επιστήμονες των τμημάτων Τεχνικής Υποστήριξης της QIAGEN είναι πάντοτε πρόθυμοι να απαντήσουν σε τυχόν ερωτήσεις σχετικά με τις πληροφορίες ή/και τα πρωτόκολλα που περιέχονται στο παρόν εγχειρίδιο ή τις τεχνολογίες προετοιμασίας δειγμάτων και προσδιορισμού (για πληροφορίες επικοινωνίας επισκεφθείτε τον ιστότοπο www.qiagen.com).

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Φραγμένη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy MinElute

- | | | |
|----|---------------------------------------|---|
| α) | Πολύ μεγάλη ποσότητα αρχικού υλικού | Μειώστε την ποσότητα του αρχικού υλικού. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιείται η σωστή ποσότητα αρχικού υλικού (βλ. σελίδα 12). |
| β) | Πολύ χαμηλή θερμοκρασία φυγοκέντρησης | Η θερμοκρασία φυγοκέντρησης θα πρέπει να είναι 15–25°C. Μερικές φυγόκεντροι μπορεί να ψυχθούν κάτω των 15°C, ακόμη και όταν έχουν ρυθμιστεί στους 20°C. Αυτό μπορεί να προκαλέσει τον σχηματισμό ιζημάτων στη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy MinElute. Εάν συμβεί αυτό, ρυθμίστε τη θερμοκρασία φυγοκέντρησης στους 25°C. |

Χαμηλή απόδοση RNA

- | | | |
|----|--|---|
| α) | Κακή ποιότητα αρχικού υλικού | Τα δείγματα που έχουν μονιμοποιηθεί για περισσότερες από 24 ώρες ή έχουν φυλαχθεί για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα μπορεί να περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα χρησιμοποιήσιμου RNA. Οι τομές που έχουν στερεωθεί σε πλακίδια μικροσκοπησης μπορεί να δώσουν πολύ μικρή ποσότητα χρησιμοποιήσιμου RNA λόγω της παρατεταμένης έκθεσης στον αέρα. |
| β) | Πολύ μεγάλη ποσότητα αρχικού υλικού | Η υπερφόρτωση της στήλης φυγοκέντρησης RNeasy MinElute μειώνει σημαντικά τις αποδόσεις νουκλεϊκών οξέων. Μειώστε την ποσότητα του αρχικού υλικού (βλ. σελίδα 12). |
| γ) | RNA που παραμένει δεσμευμένο στη μεμβράνη της στήλης φυγοκέντρησης RNeasy MinElute | Επαναλάβετε την έκλουση του RNA, αλλά επώαστε τη στήλη φυγοκέντρησης RNeasy Min Elute στην επιτραπέζια φυγόκεντρο για 10 λεπτά με RNFW πριν από τη φυγοκέντρηση. |
| γ) | Ακατάλληλη φύλαξη ρυθμιστικών διαλυμάτων/αντιδραστηρίων | Οι στήλες RNeasy MinElute Spin Columns και το DNase I πρέπει να φυλάσσονται στους 2–8°C κατά την παραλαβή του κιτ. Ελέγξτε την ορθή θερμοκρασία φύλαξης, καθώς η έκθεση σε υψηλότερες θερμοκρασίες για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια λειτουργικότητας. |

Παρατηρήσεις και προτάσεις

Χαμηλή τιμή A_{260}/A_{280}

- α) Χρησιμοποιήθηκε νερό για την αραίωση του νουκλεϊκού οξέος για τη μέτρηση A_{260}/A_{280}
- Χρησιμοποιήστε 10 mM Tris Cl, pH 7,5, όχι νερό, για την αραίωση του δείγματος πριν από τη μέτρηση της καθαρότητας.

Μόλυση DNA σε καθοδικά πειράματα

- α) Πολύ μεγάλη ποσότητα αρχικού υλικού
- Για μερικούς τύπους ιστού, η αποτελεσματικότητα της αφαίρεσης του DNA μπορεί να μειωθεί κατά την επεξεργασία πολύ μεγάλων ποσοτήτων. Εάν το εκλουσμένο RNA περιέχει σημαντική μόλυση DNA, δοκιμάστε να επεξεργαστείτε λιγότερες τομές ιστών ανά προετοιμασία
- β) Ο ιστός έχει υψηλή περιεκτικότητα σε DNA
- Κατά την επεξεργασία πολύ μεγάλων ποσοτήτων ιστών που είναι πλούσιοι σε DNA (π.χ. θυμός αδένας), το DNA μπορεί να μην διασπαστεί τελείως. Επαναλάβετε τη διαδικασία καθαρισμού χρησιμοποιώντας λιγότερες τομές ιστών.
Ελέγξτε εάν το DNase I έχει αποθηκευτεί σωστά, όπως περιγράφεται στις ενότητες «Φύλαξη και χειρισμός αντιδραστηρίων» και «Προετοιμασία αρχικού διαλύματος DNase I».
- γ) Αντίστροφη μεταγραφή με ανεπαρκή ποσότητα RNA
- Οι περισσότερες αντίστροφες μεταγραφάσες προορίζονται για χρήση με περίπου 1 μ g RNA. Σε περίπτωση διεξαγωγής αντίστροφης μεταγραφής με πολύ μικρές ποσότητες RNA, συνιστούμε τη χρήση μιας αντίστροφης μεταγραφάσας που είναι ειδικά σχεδιασμένη για αντίστροφη μεταγραφή υψηλής ευαισθησίας.

Το RNA δεν αποδίδει καλά σε καθοδικούς προσδιορισμούς/εφαρμογές

- α) Κατακερματισμένο ή αποκλεισμένο RNA λόγω τροποποίησης από τη φορμόλη
- Η επώαση στους 80°C κατά τη διαδικασία RNeasy DSP FFPE είναι κρίσιμη σημασίας για τη βέλτιστη απόδοση του RNA στην αντίστροφη μεταγραφή και άλλες ενζυμικές καθοδικές εφαρμογές. Βεβαιωθείτε ότι η θερμοκρασία επώασης διατηρείται στους 80°C για ολόκληρη τη διάρκεια επώασης 15 λεπτών.
Παρόλο που η επώαση στους 80°C εξαλείφει μερικές από τις τροποποιήσεις από τη φορμόλη, το RNA που απομονώνεται από τομές FFPE δεν αποτελεί βέλτιστο πρότυπο για ενζυμικές αντιδράσεις. Συνιστούμε τη χρήση μόνο τυχαίων εκκινητών ή ειδικών για γονίδια εκκινητών για τη σύνθεση cDNA. Συνιστούμε επίσης τη διατήρηση των αμπλικονίων σε όσο το δυνατό μικρότερο μήκος για PCR (<500 νουκλεοτίδια).
- β) Επιμόλυση με αιθανόλη
- Κατά τη διάρκεια της δεύτερης πλύσης με Buffer RPE, βεβαιωθείτε ότι φυγοκεντρίζετε σε $\geq 8.000 \times g$ για 2 λεπτά στους 15–25°C, ώστε να στεγνώσει η μεμβράνη της στήλης φυγοκέντρισης RNeasy MinElute. Μετά τη φυγοκέντριση, αφαιρέστε προσεκτικά τη στήλη από το σωληνάριο συλλογής έτσι ώστε η στήλη να μην έρθει σε επαφή με το διελθόν υγρό. Στη συνέχεια, τοποθετήστε τη στήλη σε ένα νέο σωληνάριο συλλογής και φυγοκεντρίστε σε πλήρη ταχύτητα για 5 λεπτά.
- γ) Επιμόλυση με άλατα κατά τη διάρκεια της έκλουσης RNA
- Βεβαιωθείτε ότι το Buffer RPE έχει ανασυσταθεί με προσθήκη του κατάλληλου όγκου αιθανόλης και ότι το ρυθμιστικό διάλυμα είναι σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C).
- δ) Αντίστροφη μεταγραφή με ανεπαρκή ποσότητα RNA
- Οι περισσότερες αντίστροφες μεταγραφάσες προορίζονται για χρήση με περίπου 1 μ g RNA. Σε περίπτωση διεξαγωγής αντίστροφης μεταγραφής με πολύ μικρές ποσότητες RNA, συνιστούμε τη χρήση μιας αντίστροφης μεταγραφάσας που είναι ειδικά σχεδιασμένη για αντίστροφη μεταγραφή υψηλής ευαισθησίας.

Παράρτημα: Γενικές υποδείξεις για τον χειρισμό του RNA

Χειρισμός RNA

Οι ριβονουκλεάσες (RNάσες) είναι ιδιαίτερα σταθερά και ενεργά ένζυμα τα οποία γενικά δεν χρειάζονται συμπαραγόντες για να λειτουργήσουν. Επειδή οι RNάσες αδραντοποιούνται δύσκολα και ακόμα και μικρές ποσότητες επαρκούν για την καταστροφή του RNA, δεν πρέπει να χρησιμοποιείτε πλαστικά ή γυάλινα υλικά εργαστηρίου τα οποία δεν είναι απαλλαγμένα από κάθε πρόσμιξη με RNάση. Θα πρέπει να είστε ιδιαίτεροι προσεκτικοί και να αποφεύγετε την ακούσια προσθήκη RNασών στο δείγμα RNA κατά τη διάρκεια ή μετά τη διαδικασία καθαρισμού. Για τη δημιουργία και τη διατήρηση ενός περιβάλλοντος χωρίς RNάσες, θα πρέπει να λάβετε τα ακόλουθα μέτρα προφύλαξης κατά την προκαταρκτική επεξεργασία και να χρησιμοποιείτε αναλώσιμα και μη αναλώσιμα δοχεία και διαλύματα κατά την εργασία με RNA.

Γενικός χειρισμός

Κατά την εργασία με RNA πρέπει πάντοτε να εφαρμόζονται οι κατάλληλες μικροβιολογικές ασηπτικές τεχνικές. Στα χέρια και στα σωματίδια σκόνης μπορούν να υπάρχουν βακτήρια και μύκητες, τα οποία αποτελούν τις συχνότερες πηγές επιμόλυνσης με RNάσες. Για τον λόγο αυτό, φοράτε πάντοτε γάντια από λατέξ ή βινύλιο όταν εργάζεστε με αντιδραστήρια και δείγματα RNA, για να αποφύγετε την επιμόλυνση με RNάση από την επιφάνεια του δέρματος ή από σκονισμένα όργανα του εργαστηρίου. Αλλάζετε γάντια συχνά και διατηρείτε τα σωληνάρια κλειστά όποτε είναι δυνατόν. Διατηρείτε το καθαρό RNA σε πάγο όταν υποπολλαπλάσια μεταφέρονται με πιπέτα για τις καθοδικές εφαρμογές.

Για την απομάκρυνση επιμόλυνσης με RNάση από τις επιφάνειες του πάγκου, τα μη αναλώσιμα πλαστικά υλικά και τον εργαστηριακό εξοπλισμό (π.χ. πιπέτες και δοχεία ηλεκτροφόρησης), συνιστάται η χρήση RNaseZap® (αρ. κατ. AM9780) της Ambion®. Η επιμόλυνση με RNάση μπορεί, εναλλακτικά, να απομακρυνθεί με εργαστηριακά αντιδραστήρια γενικής χρήσης. Για την απολύμανση των πλαστικών υλικών, εκπλύνετε με 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA και, στη συνέχεια, νερό ελεύθερο RNασών (βλ. ενότητα «Διαλύματα», σελίδα 27) ή εκπλύνετε με χλωροφόρμιο, εάν το πλαστικό υλικό είναι ανθεκτικό στο χλωροφόρμιο. Για την απολύμανση των δοχείων ηλεκτροφόρησης, καθαρίστε με απορρυπαντικό (π.χ., 0,5% SDS), εκπλύνετε με νερό ελεύθερο RNασών, εκπλύνετε με αιθανόλη (εάν τα δοχεία είναι ανθεκτικά στην αιθανόλη) και αφήστε τα να στεγνώσουν.

Αναλώσιμα πλαστικά υλικά

Στη διάρκεια της διαδικασίας συνιστάται η χρήση αποστειρωμένων, αναλώσιμων σωληναρίων πολυπροπυλενίου. Αυτά τα σωληνάκια είναι γενικά ελεύθερα RNασών και δεν χρειάζονται προεργασία για την αδρανοποίηση των RNασών.

Γυάλινα υλικά

Τα γυάλινα υλικά θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία πριν από τη χρήση, για τη διασφάλιση απουσίας RNασών. Τα γυάλινα υλικά που χρησιμοποιούνται για εργασίες RNA θα πρέπει, πριν από τη χρήση τους, να καθαρίζονται με απορρυπαντικό, να εκπλένονται σχολαστικά και να υποβάλλονται σε όπτηση σε φούρνο στους 240°C για τουλάχιστον 4 ώρες (κατά τη διάρκεια της νύχτας, εάν είναι πιο βολικό). Πολλές RNάσες δεν αδρανοποιούνται μετά από απλή αποστείρωση σε αυτόκαυστο. Εναλλακτικά, τα γυάλινα υλικά μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία με DEPC (πυροανθρακικό διαιθύλιο), όπως περιγράφεται στην ενότητα «Διαλύματα» παρακάτω.

Διαλύματα

Τα διαλύματα (νερό και άλλα διαλύματα) θα πρέπει να υποβάλλονται σε επεξεργασία με 0,1% DEPC. Το DEPC είναι ένας ισχυρός, αλλά όχι απόλυτος, αναστολέας RNAσών. Χρησιμοποιείται συχνά σε συγκέντρωση 0,1% για την αδρανοποίηση RNAσών σε γυάλινα ή πλαστικά υλικά, ή για την παρασκευή διαλυμάτων ή νερού χωρίς RNάσες. Το DEPC αδρανοποιεί τις RNάσες μέσω ομοιοπολικής μετατροπής. Προσθέστε 0,1 ml DEPC σε 100 ml του διαλύματος προς επεξεργασία και ανακινήστε έντονα για να ενσωματωθεί το DEPC στο διάλυμα. Αφήστε το διάλυμα να επωαστεί για 12 ώρες στους 37°C. Τοποθετήστε σε αυτόκαυστο για 15 λεπτά ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ίχνη DEPC. Το DEPC θα αντιδράσει με πρωτοταγείς αμίνες και δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας για την επεξεργασία ρυθμιστικών διαλυμάτων Tris. Το DEPC είναι ιδιαίτερα ασταθές παρουσία ρυθμιστικών διαλυμάτων Tris και αποδομείται ταχέως σε αιθανόλη και CO₂. Κατά την προετοιμασία ρυθμιστικών διαλυμάτων Tris υποβάλετε πρώτα το νερό σε επεξεργασία με DEPC και κατόπιν διαλύστε το Tris για να παρασκευάσετε το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Ίχνη του DEPC θα μετατρέψουν υπολείμματα πουρινών σε RNA μέσω καρβαιοξυλίωσης. Το καρβαιοξυλιωμένο RNA μεταφράζεται με πολύ μικρή αποτελεσματικότητα σε ακυτταρικά συστήματα. Εντούτοις, η ικανότητά του να δημιουργεί υβρίδια DNA:RNA ή RNA:RNA δεν επηρεάζεται σημαντικά εκτός και εάν έχει τροποποιηθεί μεγάλο τμήμα των υπολειμμάτων πουρινών. Το υπολειμματικό DEPC πρέπει να απομακρύνεται πάντοτε από διαλύματα ή δοχεία με αποστείρωση σε αυτόκαυστο ή θέρμανση στους 100°C για 15 λεπτά.

Σημείωση: Τα ρυθμιστικά διαλύματα RNeasy είναι εγγυημένα ελεύθερα RNAσών χωρίς τη χρήση επεξεργασίας με DEPC, συνεπώς είναι ελεύθερα από κάθε μόλυνση DEPC.

Πληροφορίες παραγγελίας

Προϊόν	Περιεχόμενα	Αρ. κατ.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Columns, σωληνάρια έκλουσης, σωληνάρια πλύσης, σωληνάρια λύσης, αντιδραστήρια και ρυθμιστικά διαλύματα ελεύθερα RNAσών	73604

Για ενημερωμένες πληροφορίες σχετικά με τις άδειες χρήσης και για δηλώσεις αποποίησης ευθύνης σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, βλ. εγχειρίδιο του αντίστοιχου kit της QIAGEN ή το κατάλληλο εγχειρίδιο χρήσης. Οι οδηγίες και τα εγχειρίδια χρήστη των kit QIAGEN είναι διαθέσιμα στον ιστότοπο www.qiagen.com. Μπορείτε επίσης να τα ζητήσετε από το τμήμα Τεχνικών Υπηρεσιών της QIAGEN ή τον αντιπρόσωπο της περιοχής σας.

Σημειώσεις

Σημειώσεις

Άδεια περιορισμένης χρήσης για το RNeasy DSP FFPE Kit

Η χρήση αυτού του προϊόντος συνεπάγεται την αποδοχή εκ μέρους του αγοραστή ή του χρήστη του προϊόντος των παρακάτω όρων:

1. Το προϊόν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποκλειστικά και μόνο όπως ορίζεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν και όπως ορίζεται στο παρόν εγχειρίδιο και μόνο με τα εξαρτήματα που περιλαμβάνονται στο kit. Η QIAGEN δεν παρέχει άδεια χρήσης υπό οποιαδήποτε πνευματική ιδιοκτησία της για τη χρήση ή ενσωμάτωση των παρεχόμενων συστατικών αυτού του kit σε οποιαδήποτε συστατικά που δεν περιλαμβάνονται σε αυτό το kit, παρά μόνον όπως περιγράφεται στα πρωτόκολλα που παρέχονται μαζί με το προϊόν, στο παρόν εγχειρίδιο και στα συμπληρωματικά πρωτόκολλα που διατίθενται στον ιστότοπο www.qiagen.com. Ορισμένα από αυτά τα επιπλέον πρωτόκολλα έχουν παρασχεθεί από χρήστες της QIAGEN για χρήστες της QIAGEN. Αυτά τα πρωτόκολλα δεν έχουν ελεγχθεί διεξοδικά ή βελτιστοποιηθεί από την QIAGEN. Η QIAGEN δεν εγγυάται για αυτά και δεν παρέχει καμία εγγύηση ότι δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
2. Εκτός από τις άδειες χρήσης που αναφέρονται ρητά, η QIAGEN δεν εγγυάται ότι αυτό το kit ή/και η χρήση/οι χρήσεις του δεν παραβιάζουν δικαιώματα τρίτων.
3. Αυτό το kit και τα συστατικά του παρέχονται με άδεια χρήσης για μία μόνο χρήση και δεν επιτρέπεται η επαναχρησιμοποίηση, η εκ νέου επεξεργασία ή η μεταπώλησή τους.
4. Η QIAGEN αποποιείται ειδικά κάθε άλλης άδειας χρήσης, ρητής ή σιωπηρής, εκτός από εκείνες που αναφέρονται ρητά.
5. Ο αγοραστής και ο χρήστης του kit συμφωνούν να μην προβούν και να μην επιτρέψουν σε άλλο πρόσωπο να προβεί σε ενέργειες οι οποίες θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε ή να διευκολύνουν τις ενέργειες που απαγορεύονται σύμφωνα με τα προαναφερθέντα. Η QIAGEN διατηρεί το δικαίωμα να επιβάλει τις απαγορεύσεις της παρούσας Άδειας περιορισμένης χρήσης σε οποιοδήποτε δικαστήριο και πρέπει να αποζημιωθεί για όλες τις ερευνητικές και δικαστικές δαπάνες της, συμπεριλαμβανομένων των δικηγορικών αμοιβών, στο πλαίσιο οποιασδήποτε ενέργειας για την επιβολή της παρούσας Σύμβασης περιορισμένης άδειας χρήσης ή οποιοδήποτε εκ των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας της σχετικά με το kit ή/και τα συστατικά του.

Για τους ενημερωμένους όρους της άδειας, βλ. www.qiagen.com.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (όμιλος QIAGEN), Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific ή θυγατρικές της), Οι καταχωρισμένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται στο παρόν έγγραφο δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευόμενα από τον νόμο, ακόμα και εάν αυτό δεν υποδεικνύεται ρητώς.
08/2017 HB-2416-001 1106945 © 2012–2017 QIAGEN, με την επιφύλαξη παντός δικαιώματος.

Παραγγελίες www.qiagen.com/shop | Τεχνική υποστήριξη support.qiagen.com | Ιστότοπος www.qiagen.com