

2017. december

# QIASymphony<sup>®</sup> SP protokoll lap

Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP és Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

Jelen dokumentum a QIASymphony DSP DNA Mini Kit 1. verziójához készült Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP és Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP *QIASymphony SP protokoll lap*, 3. átdolgozás.

## Általános információk

A QIASymphony DSP DNA kit in vitro diagnosztikai használatra szolgál.

Ezek a protokollok a szövetekből és formalinban fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) szövetekből származó összes DNS tisztítására szolgálnak QIASymphony SP készülék és QIASymphony DSP DNA Mini Kit alkalmazásával.

A minta típusától függően vagy az alacsony tartalmú (low content, LC), vagy a magas tartalmú (high content, HC) protokoll alkalmazását javasoljuk. A magas tartalmú protokollal történő feldolgozás esetén a szövetek DNS-tartalma magasabb lesz, de ha magas DNS-koncentrációra van szükség, akkor az alacsony tartalmú protokoll alkalmazandó kis elúciós térfogattal (50 µl). FFPE szövetek esetén az alacsony tartalmú protokoll alkalmazását javasoljuk.

### Alacsony tartalmú protokoll

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (katalógusszám: 937236)
<b>Mintaanyag</b>	FFPE szövet és szövet* Egy preparátumban legfeljebb 4, egyenként legfeljebb 10 µm vastagságú FFPE szövetmetszet vagy 8, egyenként legfeljebb 5 µm vastagságú és 250 mm <sup>2</sup> felületű metszet kombinálható.
<b>Protokoll neve</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Alapértelmezett tesztkontrollkészlet</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Elúciós térfogat</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl, illetve 400 µl
<b>Szükséges szoftververzió</b>	4.0-s vagy későbbi verzió

\* A szövetmintákkal kapcsolatos tájékoztatásért lásd a magas tartalmú protokollt.

### Magas tartalmú protokoll

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (katalógusszám: 937236)
<b>Mintaanyag</b>	Szövet Ha nem áll rendelkezésre a várható hozammal kapcsolatos információ, a kezdéshez 25 mg mintaanyag alkalmazását javasoljuk. A kapott hozamtól függően a minta mennyisége a későbbi preparátumoknál növelhető.
<b>Protokoll neve</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Alapértelmezett tesztkontrollkészlet</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Elúciós térfogat</b>	100 µl, 200 µl, illetve 400 µl
<b>Szükséges szoftververzió</b>	4.0-s vagy későbbi verzió

## Szükséges, de nem biztosított anyagok

### Minden mintatípushoz

- ATL puffer, 4 x 50 ml (katalógusszám: 939016)
- Az RNS-tartalom minimalizálásához: DNáz-mentes RNáz A (100 mg/ml törzsoldat)

### FFPE szövethez (xilolmentes deparaffinálás)

- Deparaffináló oldat (katalógusszám: 939018)

### FFPE szövethez (deparaffinálás xilollal)

- (99–100%-os) xilol
- (96–100%-os) etanol\*

## „Sample” (Minta) fiók

<b>Mintatípus</b>	FFPE szövet és szövet
<b>Bevitt mintatérfogot</b>	220 µl (mintánként, protokollonként szükséges)†
<b>Feldolgozott mintatérfogot</b>	200 µl
<b>Elsődleges mintacsövek</b>	n.a.
<b>Másodlagos mintacsövek</b>	További tájékoztatásért lásd <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
<b>Inzertek</b>	Az alkalmazott mintacső típusától függ; további tájékoztatásért lásd <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

† A magas és alacsony tartalmú protokollnál egyaránt igaz, hogy a rendszer nem ismeri fel, ha a mintatérfogot 220 µl-nél kevesebb, mivel a minták átvitele folyadékszint-észlelés nélkül történik. Ezért mindenképp gondoskodjon róla, hogy a bevitt mintatérfogot 220 µl legyen.

n.a. = nem alkalmazható.

## „Reagents and Consumables” (Reagensek és fogyóeszközök) fiók

<b>A1 és/vagy A2 pozíció</b>	Reagenskazetta
<b>B1 pozíció</b>	n.a.
<b>Hegyalvány-tartó, 1–17.</b>	Egyszer használatos, szűrővel rendelkező hegyek, 200 µl vagy 1500 µl
<b>1–4. számú egységdoboz-tartó</b>	Minta-előkészítő kazettákat vagy 8-as rúdburkolatokat tartalmazó egységdobozok

n.a. = nem alkalmazható.

\* Ne használjon denaturált alkoholt; a denaturált alkohol további anyagokat, például metanolt vagy metil-etil-ketont is tartalmaz.

## „Waste” (Hulladék) fiók

1–4. számú egységdoboz-tartó	Üres egységdobozok
Hulladékgyűjtő zsák tartója	Hulladékgyűjtő zsák
Folyékonyhulladék-gyűjtő palack tartója	Üres folyékonyhulladék-gyűjtő palack

## „Eluate” (Eluátum) fiók

Elúciós állvány (az 1. nyílás, hűtő pozíció alkalmazását javasoljuk)	További tájékoztatásért lásd <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
--	---

## Szükséges műanyag eszközök

Műanyag eszköz	Egy köteg, 24 minta*	Két köteg, 48 minta*	Három köteg, 72 minta*	Négy köteg, 96 minta*
Egyszer használatos, szűrővel rendelkező hegyek, 200 µl <sup>††</sup>	26	50	74	98
Egyszer használatos, szűrővel rendelkező hegyek, 1500 µl <sup>††</sup>	72	136	200	264
Minta-előkészítő kazetták <sup>§</sup>	21	42	63	84
8-as rúdburkolatok <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Ha kötegenként 24-nél kevesebb mintát használ, csökken a futtatásonként szükséges egyszer használatos, szűrővel rendelkező hegyek száma.

<sup>†</sup> Egy hegytartó állványon 32 darab szűrővel rendelkező hegy van.

<sup>††</sup> Szűrővel rendelkező hegyek száma reagenskazettánként, az 1 leltárellenőrzéshez szükséges szűrővel ellátott hegyeket is beleszámítva.

<sup>§</sup> Egy egységdoboz 28 minta-előkészítő kazettát tartalmaz.

<sup>¶</sup> Egy egységdoboz tízenkét 8-as rúdburkolatot tartalmaz.

**Megjegyzés:** A beállítások függvényében a szűrővel rendelkező hegyek megadott száma eltérhet az érintőképernyőn megjelenített számoktól. A lehető legnagyobb számú hegy betöltését javasoljuk.

## Elúciós térfogat

Az elúciós térfogat ki van választva az érintőképernyőn. A minta típusától és DNS-tartalmától függően a végső eluátum akár 15 µl-rel is kevesebb lehet, mint a kiválasztott térfogat. Mivel az eluátum térfogata változhat, javasoljuk, hogy az átvitelt megelőzően az eluátum térfogatát nem ellenőrző automata tesztbeállítási rendszer alkalmazása esetén ellenőrizték a tényleges eluátumtérfogatot. A kisebb térfogattal végzett eluálás növeli a végső DNS-koncentrációt, de kissé csökkenti a hozamot. A tervezett későbbi („downstream”) alkalmazáshoz megfelelő elúciós térfogat használatát javasoljuk.

## A mintaanyag előkészítése

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (safety data sheet, SDS) tartalmazzák, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

### A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempont

- A QIASymphony mágneses részecskéi egyidejűleg az RNS és DNS tisztítását is elvégzik, amennyiben mindkettő jelen van a mintában. A minta RNS-tartalmának csökkentése érdekében az adott előkezelő protokollban jelzett lépésben adjon RNáz A-t a mintához.

### Kezdés előtti teendők

- Ellenőrizze, hogy van-e fehér csapadék az ATL pufferben. Amennyiben szükséges, inkubálja 30 percen keresztül 37 °C-on, és időnként rázogassa meg, hogy a csapadék feloldódjon.
- Állítson be egy ThermoMixer®-t vagy rázóinkubátort az adott előkezeléshez szükséges hőmérsékletre.\*

### Szövetek

A DNS tisztításához alkalmazható friss és fagyasztott szövet is. A DNS-hozam és -minőség függ a szövettípustól, a forrástól és a tárolási körülményektől. A friss szövet apró darabokra vágható, és -20 °C-on vagy -80 °C-on tárolható a feldolgozás előtt. Általánosságban a nagyobb DNS-hozamot biztosító magas tartalmú protokoll alkalmazását javasoljuk. Az alacsony tartalmú protokoll alkalmazása 50 µl elúciós térfogattal kombinálva akkor javasolt, ha magas DNS-koncentrációkra van szükség a további (downstream) elemzésekhez. Ha nem áll rendelkezésre a várható hozammal kapcsolatos információ, a kezdéshez 25 mg mintaanyag alkalmazását javasoljuk a magas tartalmú protokoll és 200 µl elúciós térfogat alkalmazásával. A kapott hozamtól függően a későbbi preparátumoknál a minta mennyisége növelhető, illetve az elúciós térfogat csökkenthető. Felhívjuk figyelmét, hogy a preparátumok kis elúciós térfogatok melletti túltöltése a mágneses részecskék eluátumba történő átviteléhez vezethet, és hátrányosan befolyásolhatja a DNS tisztaságát és a további (downstream) elemzéseket.

\* Ellenőrizze, hogy a műszerek a gyártó utasításai szerint rendszeresen lettek ellenőrizve, karbantartva és kalibrálva.

## Szöveti előkezelési protokoll

1. Vigye át a szövetmintát egy 2 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (nincs a készletben).
2. Adjon hozzá 220 µl ATL puffert.
3. Adjon hozzá 20 µl proteináz K-t, és a cső finom ütögetésével keverje össze.

**Megjegyzés:** A QIASymphony DSP DNA Mini Kit enzimtartó állványán lévő proteináz K-t használja.

4. Helyezze a csövet ThermoMixerbe vagy rázóinkubátorba, és inkubálja 56 °C-on 900 rpm rázás mellett, a szövet teljes lízisének eléréséig.

**Megjegyzés:** A lízishez szükséges idő a feldolgozott szövettípustól függően változik. A legtöbb szövet esetében a lízis 3 órán belül lezajlik. Ha a lízis 3 óra alatt sem zajlik le teljes mértékben, amit oldhatatlan anyag jelenléte vagy nagy viszkozitású lizátum jelez, a lízisidő meghosszabbítható, illetve az oldhatatlan anyag centrifugálással eltávolítható a 6. lépésben leírtaknak megfelelően. Lehetőség van az egész éjszakai lízisre, és ez nem befolyásolja az előkészítést.

5. A minta RNS-tartalmának minimalizálásához adjon hozzá 4 µl RNáz A-t (100 mg/ml), és inkubálja 2 percre szobahőmérsékleten (15–25 °C), mielőtt folytatná a 6. lépéssel.
6. A minta homogenizálásához többször egymás után pipettázza fel és le.

**Megjegyzés:** Ha továbbra is oldhatatlan anyagdarabok láthatók, centrifugálja 3000 x g-vel 1 percen keresztül.

7. Óvatosan vigyen át a felülúszóból 220 µl-t a QIASymphony SP mintatartójával kompatibilis mintacsövekbe.

A kompatibilis mintacsövek teljes felsorolását lásd [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). 2 ml-es csövek alkalmazását javasoljuk (pl. Sarstedt®, katalógusszám: 72.693 vagy 72.608).

## FFPE szövet

A standard formalinos fixálási és paraffinba ágyazási eljárások minden esetben a nukleinsavak jelentős feltöredezését eredményezik. A DNS-fragmentáció mértékének visszaszorítása érdekében mindenképp kövesse az alábbiakat:

- A műtéti eltávolítást követően a lehető leggyorsabban fixálja a szövetmintákat 4–10%-os formalinban
- A fixálás ideje 14–24 óra legyen (a hosszabb fixálási idő nagyobb mértékű DNS-fragmentációhoz vezet, amely rontja a downstream tesztek eredményességét)

- A mintákat a beágyazás előtt alaposan dehidratálja (a visszamaradt formalin gátolhatja a proteináz K emésztést)

A DNS-tisztítás kiinduló anyagának frissen metszett FFPE szövetmetszetnek kell lennie. Egy preparátumban legfeljebb 4, egyenként legfeljebb 10 µm vastagságú szövetmetszet vagy 8, egyenként legfeljebb 5 µm vastagságú és 250 mm<sup>2</sup> felületű metszet dolgozható fel. Ha nem áll rendelkezésre a kiindulási anyag jellegével kapcsolatos információ, javasoljuk, hogy egy preparátumban kezdetben ne legyen több mint 3 metszet. A DNS-hozamtól és -tisztaságtól függően az ezt követő preparátumokban akár 8 metszet is használható.

**Megjegyzés:** Az FFPE szöveti protokollokat úgy terveztük, hogy csupán kis mennyiségű RNS-t tisztítsanak meg a DNS-sel egyidejűleg. Ez a manuális QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue kittel nyert értékekhez képest csökkent fotometriás mérési értékhez vezet.

### FFPE szöveti előkezelési protokoll

#### 1. módszer: deparaffináló oldattal végzett deparaffinálás

1. Szikével vágja le a mintablokkról a paraffinfelesleget.
2. Vágjon legfeljebb 4 darab 10 µm vastagságú metszetet vagy legfeljebb 8 darab 5 µm vastagságú metszetet.

**Megjegyzés:** Ha a minta felszíne levegővel érintkezett, dobja ki az első 2–3 metszetet.

3. Haladéktalanul helyezze a metszeteket a QIASymphony SP készülék mintatartójával kompatibilis 2 ml-es Sarstedt csőbe (nincs a készletben, katalógusszám: 72.693 vagy 72.608).
4. Adjon a metszetekhez 200 µl ATL puffert.
5. Adjon hozzá 20 µl proteináz K-t.  
**Megjegyzés:** A QIASymphony DSP DNA Mini Kit enzimtartó állványán lévő proteináz K-t használja.
6. Adjon hozzá 160 µl vagy 320 µl deparaffináló oldatot (lásd az alábbi táblázatot), és vortex keverővel keverje össze.

Metszetek vastagsága	Metszetek száma	Deparaffináló oldat térfogata
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Helyezze a csövet ThermoMixerbe vagy rázóinkubátorba, és inkubálja 56 °C-on 1 órán keresztül 1000 rpm rázás mellett, a szövet teljes lízisének eléréséig.

**Megjegyzés:** A lízishez szükséges idő a feldolgozott szövettípustól függően változik. A legtöbb szövet esetében a lízis 1 órán belül lezajlik. Ha a lízis 1 óra alatt sem zajlik le teljes mértékben, amit oldhatatlan anyag jelenléte jelez, a lízisidő meghosszabbítható, illetve az oldhatatlan anyag centrifugálással szemcsésíthető a 10. lépésben leírtaknak megfelelően. Lehetőség van az egész éjszakás lízisre, és ez nem befolyásolja az előkészítést.

8. Inkubálja 90 °C-on 1 órán keresztül.

**Megjegyzés:** Az ATL pufferben, 90 °C-on végzett inkubálás részben visszafordítja a nukleinsavak formaldehid hatására bekövetkező módosulását. A hosszabb inkubálási idő vagy magasabb inkubálási hőmérséklet a DNS nagyobb mértékű fragmentálódásához vezethet. Egyetlen fűtőblokk használatakor az 56 °C-on végzett inkubálást követően hagyja a mintát szobahőmérsékleten, amíg a fűtőblokk hőmérséklete el nem éri a 90 °C-ot.

9. A minta RNS-tartalmának minimalizálásához adjon az alsó fázishoz 2 µl RNáz A-t (100 mg/ml), és inkubálja 2 percig szobahőmérsékleten, mielőtt folytatná a 10. lépéssel. Az RNáz A hozzáadása előtt hagyja a mintát szobahőmérsékletre hűlni.
10. Centrifugálja teljes sebességgel 1 percig szobahőmérsékleten.
11. Óvatosan vigye át a (mindkét fázist tartalmazó) csöveket a QIASymphony SP mintatartójára.

## 2. módszer: xilollal végzett deparaffinálás

1. Szikével vágja le a mintablokkról a paraffinfelesleget.
2. Vágjon legfeljebb 4 darab 10 µm vastagságú metszetet vagy legfeljebb 8 darab 5 µm vastagságú metszetet.

**Megjegyzés:** Ha a minta felszíne levegővel érintkezett, dobja ki az első 2–3 metszetet.
3. Haladéktalanul helyezze a metszeteket 1,5 vagy 2 ml-es mikrocentrifuga-csőbe (nincs a készletben), és adjon 1 ml xilolt a mintához. Zárja le a fedelet, és erőteljesen kevertesse 10 másodpercig.
4. Centrifugálja teljes sebességgel 2 percig szobahőmérsékleten.
5. Pipettázással távolítsa el a felülúszót. Vigyázzon, hogy a pelletből ne kerüljön a pipettába.
6. Adjon a pellethez 1 ml (96–100%-os) etanolt, és keverje össze vortex keverővel.

**Megjegyzés:** Az etanol kivonja a xilolmaradványt a mintából.
7. Centrifugálja teljes sebességgel 2 percig szobahőmérsékleten.



8. Pipettázással távolítsa el a felülúszót. Vigyázzon, hogy a pelletből ne kerüljön a pipettába.  
**Megjegyzés:** Óvatosan, vékony pipettahegyet használva távolítsa el a maradék etanolt.
9. Nyissa ki a csövet, és inkubálja szobahőmérsékleten (15–25 °C) 10 percig vagy mindaddig, amíg az összes etanolmaradvány el nem párolog.  
**Megjegyzés:** Az inkubálás legfeljebb 37 °C-os hőmérsékleten történjen.
10. 220 µl ATL pufferben reszuszpendálja a pelletet.
11. Adjon hozzá 20 µl proteináz K-t, és vortex keverővel keverje.  
**Megjegyzés:** A QIASymphony DSP DNA Mini Kit enzimtartó állványán lévő proteináz K-t használja.
12. Inkubálja 56 °C-on 1 órán keresztül (vagy a minta teljes líziséig).  
**Megjegyzés:** A lízishez szükséges idő a feldolgozott szövettípustól függően változik. A legtöbb szövet esetében a lízis 1 órán belül lezajlik. Ha a lízis 1 óra alatt sem zajlik le teljes mértékben, amit oldhatatlan anyag jelenléte jelez, a lízisidő meghosszabbítható, illetve az oldhatatlan anyag centrifugálással eltávolítható a 16. lépésben leírtaknak megfelelően. Lehetőség van az egész éjszakás lízisre, és ez nem befolyásolja az előkészítést.
13. Inkubálja 90 °C-on 1 órán keresztül.  
**Megjegyzés:** Az ATL pufferben, 90 °C-on végzett inkubálás részben visszafordítja a nukleinsavak formaldehid hatására bekövetkező módosulását. A hosszabb inkubálási idő vagy magasabb inkubálási hőmérséklet a DNS nagyobb mértékű fragmentálódásához vezethet. Egyetlen fűtőblokk használatakor az 56 °C-on végzett inkubálást követően hagyja a mintát szobahőmérsékleten, amíg a fűtőblokk hőmérséklete el nem éri a 90 °C-ot.
14. A fedél belsején lévő cseppek eltávolításához rövid ideig centrifugálja a mintát.
15. A minta RNS-tartalmának minimalizálásához adjon hozzá 2 µl RNáz A-t (100 mg/ml), és inkubálja 2 percig szobahőmérsékleten, mielőtt folytatná a 16. lépéssel. Az RNáz A hozzáadása előtt hagyja a mintát szobahőmérsékletre hűlni.
16. Óvatosan vigyen át a lizátumból 220 µl-t a QIASymphony SP mintatartójával kompatibilis mintacsövekbe.  
**Megjegyzés:** Ha a lizátum emésztetlen anyagot tartalmaz, centrifugálja teljes sebességgel 2 percig szobahőmérsékleten, mielőtt átvinné a felülúszót a mintacsövekbe. A kompatibilis mintacsövek teljes felsorolását lásd [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). 2 ml-es csövek alkalmazását javasoljuk (pl. Sarstedt, katalógusszám: 72.693 vagy 72.608).

## Átdolgozási előzmények

Dokumentum átdolgozási előzményei	
R3 12/2017	Frissítés a QIASymphony 5.0-s szoftververzióknak megfelelően

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

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN csoport); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). A dokumentumban használt bejegyzett nevek, védjegyek stb. akkor sem tekinthetők a törvényi védelem kivétel esőnek, ha nem rendelkeznek külön jelöléssel.  
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, minden jog fenntartva.

---

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

