

Αύγουστος 2015

# Φύλλο πρωτοκόλλου QIAasymphony<sup>®</sup> SP

Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP και  
Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

Το παρόν έγγραφο είναι το Φύλλο πρωτοκόλλου QIAasymphony SP *Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP*  
και *Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP*, R2, για το κιτ έκδοση 1.

## Γενικές πληροφορίες

Για διαγνωστική χρήση in vitro.

Αυτά τα πρωτόκολλα αφορούν τον καθαρισμό ολικού DNA από ιστούς μονιμοποιημένους σε φορμόλη και εγκλεισμένους σε παραφίνη (FFPE) με χρήση του QIASymphony® SP και του kit QIASymphony DSP DNA Mini.

Ανάλογα με τον τύπο ιστού, συνιστούμε τη χρήση είτε του πρωτοκόλλου χαμηλής περιεκτικότητας (LC) είτε του πρωτοκόλλου υψηλής περιεκτικότητας (HC). Οι ιστοί θα έχουν αυξημένες αποδόσεις DNA εάν υποβληθούν σε επεξεργασία με το πρωτόκολλο υψηλής περιεκτικότητας, ενδεχομένως όμως θα χρειαστεί να χρησιμοποιήσετε το πρωτόκολλο χαμηλής περιεκτικότητας εάν απαιτείται υψηλή συγκέντρωση DNA σε συνδυασμό με χαμηλό όγκο έκλουσης (50 µl). Για ιστούς FFPE συνιστούμε τη χρήση του πρωτοκόλλου χαμηλής περιεκτικότητας.

### Πρωτόκολλο χαμηλής περιεκτικότητας

<b>Κιτ</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. καταλ. 937236)
<b>Υλικό δειγμάτων</b>	Ιστός FFPE και ιστός* Σε μία προετοιμασία μπορούν να συνδυαστούν έως και 4 τομές ιστού FFPE, πάχους έως 10 µm έκαστη ή 8 τομές, πάχους έως 5 µm έκαστη και επιφάνεια έως 250 mm <sup>2</sup> .
<b>Ονομασία πρωτοκόλλου</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Προκαθορισμένο σετ μαρτύρων προσδιορισμού</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Όγκος έκλουσης</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl ή 400 µl
<b>Απαιτούμενη έκδοση λογισμικού</b>	Έκδοση 4,0

\* Ανατρέξτε στο πρωτόκολλο υψηλής περιεκτικότητας για πληροφορίες σχετικά με τα δείγματα ιστού.

### Πρωτόκολλο υψηλής περιεκτικότητας

<b>Κιτ</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (αρ. καταλ. 937236)
<b>Υλικό δειγμάτων</b>	Ιστός Εάν δεν διατίθενται πληροφορίες σχετικά με την αναμενόμενη απόδοση, συνιστούμε να ξεκινήσετε με 25 mg δείγματος. Ανάλογα με την επιτευχθείσα απόδοση μπορείτε να αυξήσετε την ποσότητα του δείγματος στις επόμενες προετοιμασίες.
<b>Ονομασία πρωτοκόλλου</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Προκαθορισμένο σετ μαρτύρων προσδιορισμού</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Όγκος έκλουσης</b>	100 µl, 200 µl ή 400 µl
<b>Απαιτούμενη έκδοση λογισμικού</b>	Έκδοση 4,0



## Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

### Για όλους τους τύπους δειγμάτων

- Ρυθμιστικό διάλυμα ATL, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, αρ. καταλ. 939016)
- Για την ελαχιστοποίηση της περιεκτικότητας σε RNA: RNάση A ελεύθερη DNάσης (πρωτογενές διάλυμα 100 mg/ml)

### Για ιστό FFPE (αποπαραφίνωση χωρίς ξυλένιο)

- Διάλυμα αποπαραφίνωσης (αρ. καταλ. 939018)

### Για ιστό FFPE (αποπαραφίνωση με ξυλένιο)

- Ξυλένιο (99–100%)
- Αιθανόλη (96–100%)\*

## Συρτάρι "Sample" (δείγμα)

Τύπος δείγματος	Ιστός FFPE και ιστός*
Όγκος εισαγόμενου δείγματος	220 µl (απαιτούνται ανά δείγμα, ανά πρωτόκολλο)*
Όγκος δείγματος που υποβάλλεται σε επεξεργασία	200 µl
Πρώτα σωληνάρια δείγματος	δεν εφαρμ.
Δεύτερα σωληνάρια δείγματος	Βλ. <a href="http://www.qiagen.com/qto/dsphandbooks">www.qiagen.com/qto/dsphandbooks</a> για περισσότερες πληροφορίες.
Ένθετα	Εξαρτάται από τον τύπο σωληναρίου δείγματος που χρησιμοποιείται. Για περισσότερες πληροφορίες, βλ. <a href="http://www.qiagen.com/qto/dsphandbooks">www.qiagen.com/qto/dsphandbooks</a> .

† Για πρωτόκολλα υψηλής και χαμηλής περιεκτικότητας, το σύστημα δεν μπορεί να διαπιστώσει εάν ο όγκος δείγματος είναι μικρότερος από 220 µl, διότι η μεταφορά δείγματος πραγματοποιείται χωρίς ανίχνευση στάθμης υγρού. Επομένως, πρέπει να διασφαλίσετε ότι ο όγκος εισαγόμενου δείγματος είναι 220 µl.

δεν εφαρμ. = δεν εφαρμόζεται.

\* Μην χρησιμοποιείτε μετουσιωμένη αλκοόλη, η οποία περιέχει πρόσθετες ουσίες όπως μεθανόλη ή μεθυλαιθυλοκετόνη.

## Συρτάρι "Reagents and Consumables" (αντιδραστήρια και αναλώσιμα)

Θέση A1 και/ή A2	Φύσιγγα αντιδραστηρίων
Θέση B1	δεν εφαρμ.
Στήριγμα θήκης ρυγχών 1–17	Αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, 200 μl ή 1500 μl
Στήριγμα κουτιού μονάδων 1–4	Κουτιά μονάδων που περιέχουν φύσιγγες προετοιμασίας δειγμάτων ή περιβλήματα 8 ράβδων

δεν εφαρμ. = δεν εφαρμόζεται.

## Συρτάρι "Waste" (απόβλητα)

Στήριγμα κουτιού μονάδων 1–4	Κενά κουτιά μονάδων
Στήριγμα σακούλας αποβλήτων	Σακούλα αποβλήτων
Στήριγμα φιάλης υγρών αποβλήτων	Κενή φιάλη υγρών αποβλήτων

## Συρτάρι "Eluate" (έκλουσμα)

Θήκη έκλουσης (συνιστούμε τη χρήση της υποδοχής 1, θέση ψύξης)	Βλ. <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> για περισσότερες πληροφορίες.
--	--

## Απαιτούμενα πλαστικά υλικά

	Μία παρτίδα, 24 δείγματα*	Δύο παρτίδες, 48 δείγματα*	Τρεις παρτίδες, 72 δείγματα*	Τέσσερις παρτίδες, 96 δείγματα*
Αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, 200 μl <sup>†</sup>	26	50	74	98
Αναλώσιμα ρύγχη φίλτρου, 1500 μl <sup>†</sup>	72	136	200	264
Φύσιγγες προετοιμασίας δειγμάτων <sup>§</sup>	21	42	63	84
Περιβλήματα 8 ράβδων <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Η χρήση λιγότερων από 24 δείγματα ανά παρτίδα μειώνει τον αριθμό των αναλωσίμων ρυγχών φίλτρου που απαιτούνται ανά εκτέλεση.

<sup>†</sup> Κάθε θήκη ρυγχών φίλτρου περιέχει 32 ρύγχη φίλτρου.

<sup>‡</sup> Ο αριθμός των απαιτούμενων ρυγχών φίλτρου περιλαμβάνει ρύγχη φίλτρου για 1 σάρωση υλικού ανά φύσιγγα αντιδραστηρίων.

<sup>§</sup> Κάθε κουτί μονάδων περιέχει 28 φύσιγγες προετοιμασίας δειγμάτων.

<sup>¶</sup> Κάθε κουτί μονάδων περιέχει δώδεκα περιβλήματα 8 ράβδων.

**Σημείωση:** Ανάλογα με τις εκάστοτε ρυθμίσεις, οι αριθμοί των ρυγχών φίλτρου ενδέχεται να διαφέρουν από εκείνους που προβάλλονται στην οθόνη αφής. Συνιστούμε τη φόρτωση του μέγιστου δυνατού αριθμού ρυγχών.

## Όγκος έκλουσης

Ο όγκος έκλουσης επιλέγεται στην οθόνη αφής. Ανάλογα με τον τύπο δείγματος και την περιεκτικότητα σε DNA, ο τελικός όγκος εκλούσματος μπορεί να είναι έως και 15 μl μικρότερος από τον επιλεγμένο όγκο. Λόγω των ενδεχόμενων αποκλίσεων του όγκου εκλούσματος, συνιστούμε τον έλεγχο του πραγματικού όγκου εκλούσματος όταν χρησιμοποιείτε αυτοματοποιημένο σύστημα ρύθμισης παραμέτρων προσδιορισμού που δεν επαληθεύει τον όγκο εκλούσματος πριν την μεταφορά. Η έκλουση σε μικρότερους όγκους αυξάνει την τελική συγκέντρωση DNA, μειώνει ωστόσο ελαφρά την απόδοση. Συνιστούμε τη χρήση κατάλληλου όγκου έκλουσης για την προοριζόμενη καθοδική (downstream) εφαρμογή.

## Προετοιμασία του δείγματος

Όταν εργάζεστε με χημικά θα πρέπει πάντοτε να φοράτε προστατευτική ποδιά εργαστηρίου, γάντια μίας χρήσης και προστατευτικά γυαλιά. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στα σχετικά δελτία δεδομένων ασφάλειας (SDS), τα οποία είναι διαθέσιμα από τον προμηθευτή του προϊόντος.

## Σημαντική υπόδειξη πριν από την έναρξη

- Τα μαγνητικά σωματίδια QIAasympphony καθαρίζουν παράλληλα RNA και DNA, εάν υπάρχουν αμφότερα στο δείγμα. Για να ελαχιστοποιήσετε την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA, προσθέστε RNάση A στο δείγμα στο βήμα που υποδεικνύεται στο αντίστοιχο πρωτόκολλο προκαταρκτικής επεξεργασίας.

## Απαραίτητες ενέργειες πριν από την έναρξη

- Ελέγξτε το ρυθμιστικό διάλυμα ATL ως προς την παρουσία λευκού ιζήματος. Εάν είναι απαραίτητο, επωάστε για 30 λεπτά στους 37°C με περιστασιακή ανακίνηση για την διάλυση του ιζήματος.
- Ρυθμίστε ένα θερμομίκτη ή μία συσκευή ανακίνησης–επώασης στην απαιτούμενη θερμοκρασία για την σχετική προκαταρκτική επεξεργασία..\*

\* Διασφαλίστε ότι τα όργανα έχουν ελεγχθεί, συντηρηθεί και βαθμονομηθεί σε τακτά χρονικά διαστήματα, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

## Ιστοί

Για τον καθαρισμό του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί νωπός και κατεψυγμένος ιστός. Η απόδοση και η ποιότητα του DNA εξαρτάται από τον τύπο, την προέλευση και τις συνθήκες φύλαξης του ιστού. Ο νωπός ιστός μπορεί να κοπεί σε μικρά τεμάχια και να φυλαχθεί στους  $-20^{\circ}\text{C}$  ή  $-80^{\circ}\text{C}$  πριν από την επεξεργασία. Γενικά συνιστούμε τη χρήση του πρωτοκόλλου υψηλής περιεκτικότητας, το οποίο και παρέχει αυξημένες αποδόσεις DNA. Το πρωτόκολλο χαμηλής περιεκτικότητας, σε συνδυασμό με τον όγκο έκλουσης των 50 µl συνιστάται μόνο εάν απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις DNA για καθοδική ανάλυση. Εάν δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με την αναμενόμενη απόδοση, συνιστούμε να ξεκινήσετε με 25 mg δείγματος με χρήση του πρωτοκόλλου υψηλής περιεκτικότητας και όγκο έκλουσης 200 µl. Ανάλογα με την επιτευχθείσα απόδοση μπορείτε να αυξήσετε τον όγκο του δείγματος ή να μειώσετε τον όγκο έκλουσης στις επόμενες προετοιμασίες. Λάβετε υπόψη πως η υπερφόρτωση προετοιμασιών σε συνδυασμό με μικρούς όγκους έκλουσης μπορεί να οδηγήσει σε μεταφορά μαγνητικών σωματιδίων εντός του εκλούσματος, έχοντας δυσμενείς συνέπειες στην καθαρότητα του DNA και στην καθοδική ανάλυση.

### Πρωτόκολλο προκαταρκτικής επεξεργασίας για ιστούς

1. Μεταφέρετε το δείγμα ιστού σε σωληνάριο μικροφυγόκεντρου 2 ml (δεν παρέχεται).
2. Προσθέστε 220 µl ρυθμιστικού διαλύματος ATL.
3. Προσθέστε 20 µl πρωτεϊνάσης K και αναμείξτε με ήπια πλήξη του σωληναρίου.  
**Σημείωση:** Χρησιμοποιήστε πρωτεϊνάση K από τη θήκη ενζύμων του kit QIASymphony DSP DNA Mini
4. Τοποθετήστε το σωληνάριο σε ThermoMixer ή συσκευή ανακίνησης-επώασης και επώαστε στους  $56^{\circ}\text{C}$  με ανακίνηση στα 900 rpm ώσπου να επιτευχθεί πλήρης λύση του ιστού.  
**Σημείωση:** Ο χρόνος λύσης εξαρτάται από τον τύπο ιστού που υποβάλλεται σε επεξεργασία. Η λύση των περισσότερων ιστών ολοκληρώνεται εντός 3 ωρών. Εάν η λύση δεν έχει ολοκληρωθεί εντός 3 ωρών, γεγονός που υποδεικνύεται από την παρουσία αδιάλυτου υλικού ή διαλυμάτων λύσης υψηλού ιξώδους, μπορεί να παραταθεί ο χρόνος λύσης ή να αφαιρεθεί το αδιάλυτο υλικό με φυγοκέντριση, σύμφωνα με την περιγραφή στο βήμα 6. Η λύση κατά τη διάρκεια της νύχτας επιτρέπεται και δεν επηρεάζει την προετοιμασία.
5. Για να ελαχιστοποιήσετε την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA, προσθέστε 4 µl RNάσης A (100 mg/ml) και επώαστε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) προτού συνεχίσετε με το βήμα 6.
6. Ομογενοποιήστε το δείγμα με επαναλαμβανόμενη αναρρόφηση/εξώθηση με πιπέτα.

**Σημείωση:** Εάν παραμένουν τεμάχια αδιάλυτου υλικού, φυγοκεντρίστε σε 3000 x g για 1 λεπτό.

7. Μεταφέρετε προσεκτικά 220 μl του υπερκείμενου σε σωληνάρια δείγματος που είναι συμβατά με το φορέα δειγμάτων του QIAasymphony SP.

Για τον πλήρη κατάλογο των συμβατών σωληναρίων δείγματος,

βλ. [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Συνιστούμε τη χρήση σωληναρίων των 2 ml (π.χ. Sarstedt, αρ. καταλόγου 72.693 ή 72.608).

## Ιστός FFPE

Οι τυπικές διαδικασίες μονιμοποίησης σε φορμόλη και έγκλεισης σε παραφίνη οδηγούν πάντοτε σε σημαντικό κατακερματισμό νουκλεϊκών οξέων. Για να περιορίσετε την έκταση του κατακερματισμού του DNA, διασφαλίστε τα εξής:

- Μονιμοποιήστε τα δείγματα ιστού σε φορμόλη 4–10% το συντομότερο δυνατό μετά τη χειρουργική αφαίρεση
- Εφαρμόστε χρόνο μονιμοποίησης 14–24 ωρών (οι μεγαλύτεροι χρόνοι μονιμοποίησης επιδεινώνουν τον κατακερματισμό του DNA, οδηγώντας σε πτωχή απόδοση σε καθοδικούς προσδιορισμούς)
- Αφυδατώστε σχολαστικά τα δείγματα πριν από την έγκλειση (η παραμένουσα φορμόλη μπορεί να αναστείλει την πεπτική δράση της πρωτεϊνάσης K)

Το υλικό εκκίνησης για τον καθαρισμό του DNA θα πρέπει να είναι πρόσφατες τομές ιστού FFPE. Σε μία προετοιμασία μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία έως και 4 τομές, πάχους έως 10 μm έκαστη ή έως και 8 τομές, πάχους έως 5 μm έκαστη και επιφάνεια έως 250 mm<sup>2</sup>. Εάν δεν έχετε πληροφορίες σχετικά με τη φύση του υλικού εκκίνησης, συνιστούμε να ξεκινήσετε χρησιμοποιώντας όχι περισσότερες από 3 τομές σε μία προετοιμασία. Ανάλογα με την απόδοση και την καθαρότητα του DNA, ενδεχομένως να μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως και 8 τομές στις επόμενες προετοιμασίες

**Σημείωση:** Τα πρωτόκολλα ιστών FFPE έχουν σχεδιαστεί ειδικά ώστε να καθαρίζουν ταυτοχρόνως μικρές μόνο ποσότητες RNA. Το γεγονός αυτό θα οδηγήσει σε χαμηλότερη τιμή φωτομετρικής μέτρησης σε σύγκριση με τις τιμές που λαμβάνονται με το χειροκίνητο kit QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue.

## Πρωτόκολλο προκαταρκτικής επεξεργασίας για ιστούς FFPE

Μέθοδος 1: αποπαραφίνωση με διάλυμα αποπαραφίνωσης



- Χρησιμοποιώντας ένα νυστέρι, αποκόψτε την περίσσεια παραφίνης από το μπλοκ του δείγματος.
- Δημιουργήστε έως και 4 τομές πάχους 10 μm ή έως και 8 τομές πάχους 5 μm.  
**Σημείωση:** Εάν η επιφάνεια του δείγματος έχει εκτεθεί στον αέρα, απορρίψτε τις πρώτες 2–3 τομές.
- Τοποθετήστε αμέσως τις τομές σε σωληνάριο Sarstedt των 2 ml (δεν παρέχεται, αρ. καταλ 72.693 ή 72.608), συμβατό με τον φορέα δειγμάτων του QIASymphony SP.
- Προσθέστε 200 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL στις τομές.
- Προσθέστε 20 μl πρωτεΐνάσης K.  
**Σημείωση:** Χρησιμοποιήστε πρωτεΐνάση K από τη θήκη ενζύμων του kit QIASymphony DSP DNA Mini.
- Προσθέστε 160 μl ή 320 μl διαλύματος αποπαραφίνωσης (βλ. παρακάτω πίνακα) και αναμίξτε με ανάδευση.

Πάχος τομών	Αριθμός τομών	Όγκος
		διαλύματος αποπαραφίνωσης
5 μm	1–4	160 μl
	5–8	320 μl
10 μm	1–2	160 μl
	3–4	320 μl

- Τοποθετήστε το σωληνάριο σε θερμομίκτη ή συσκευή ανακίνησης–επώασης και επωάστε στους 56°C για 1 ώρα με ανακίνηση στις 1000 σ.α.λ., ώσπου να επιτευχθεί πλήρης λύση του ιστού.  
**Σημείωση:** Ο χρόνος λύσης εξαρτάται από τον τύπο ιστού που υποβάλλεται σε επεξεργασία. Η λύση των περισσότερων ιστών ολοκληρώνεται εντός 1 ώρας. Εάν η λύση δεν έχει ολοκληρωθεί εντός 1 ώρας, γεγονός που υποδεικνύεται από την παρουσία αδιάλυτου υλικού, μπορεί να παραταθεί ο χρόνος λύσης ή να προκληθεί καθίζηση του αδιάλυτου υλικού με φυγοκέντρωση, σύμφωνα με την περιγραφή στο βήμα 10. Η λύση κατά τη διάρκεια της νύχτας επιτρέπεται και δεν επηρεάζει την προετοιμασία.
- Επωάστε στους 90°C για 1 ώρα.  
**Σημείωση:** Η επώαση στους 90°C σε ρυθμιστικό διάλυμα ATL αναστρέφει μερικώς τις τροποποιήσεις που επέφερε η φορμαλδεΐδη στα νουκλεϊκά οξέα. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης ή οι υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω κατακερματισμό του DNA. 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 90°C.

9. Για να ελαχιστοποιήσετε την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA, προσθέστε 2 μl RNάσης A (100 mg/ml) στην κατώτερη φάση και επωάστε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προτού συνεχίσετε με το βήμα 10. Αφήστε το δείγμα να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου προτού προσθέσετε RNάση A.
10. Φυγοκεντρίστε με πλήρη ταχύτητα για 1 λεπτό, σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Μεταφέρετε προσεκτικά τα σωληνάκια (που περιέχουν και τις δύο φάσεις) στο φορέα δειγμάτων του QIAasympphony SP.

#### Μέθοδος 2: αποπαραφίνωση με χρήση ξυλενίου

1. Χρησιμοποιώντας ένα νυστέρι, αποκόψτε την περίσσεια παραφίνης από το μπλοκ του δείγματος.
2. Δημιουργήστε έως και 4 τομές πάχους 10 μm ή έως και 8 τομές πάχους 5 μm.  
**Σημείωση:** Εάν η επιφάνεια του δείγματος έχει εκτεθεί στον αέρα, απορρίψτε τις πρώτες 2–3 τομές.
3. Τοποθετήστε αμέσως τις τομές σε σωληνάριο μικροφυγόκεντρου 1,5 ή 2 ml (δεν παρέχεται), και προσθέστε 1 ml ξυλενίου στο δείγμα. Κλείστε το κάλυμμα και αναδεύστε έντονα για 10 δευτερόλεπτα.
4. Φυγοκεντρίστε με πλήρη ταχύτητα για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Απομακρύνετε το υπερκείμενο με πιπέτα. Αφήστε το ίζημα ανέπαφο.
6. Προσθέστε 1 ml αιθανόλης (96–100%) στο ίζημα και αναμίξτε με ανάδευση.  
**Σημείωση:** Η αιθανόλη εξάγει το παραμένον ξυλενίου από το δείγμα.
7. Φυγοκεντρίστε με πλήρη ταχύτητα για 2 λεπτά, σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Απομακρύνετε το υπερκείμενο με πιπέτα. Αφήστε το ίζημα ανέπαφο.  
**Σημείωση:** Απομακρύνετε προσεκτικά τυχόν παραμένουσα αιθανόλη, χρησιμοποιώντας λεπτό ρύγχος πιπέτας.
9. Ανοίξτε το σωληνάριο και επωάστε σε θερμοκρασία δωματίου (15–25°C) για 10 λεπτά ή ώσπου εξατμιστεί πλήρως η παραμένουσα αιθανόλη.  
**Σημείωση:** Η επώαση μπορεί να γίνει σε θερμοκρασίες έως 37°C.
10. Ανακατανείμτε το ίζημα σε 220 μl ρυθμιστικού διαλύματος ATL.
11. Προσθέστε 20 μl πρωτεϊνάσης K και αναμίξτε με ανάδευση.  
**Σημείωση:** Χρησιμοποιήστε πρωτεϊνάση K από τη θήκη ενζύμων του kit QIAasympphony DSP DNA Mini.
12. Επωάστε στους 56°C για 1 ώρα (ή ώσπου να επιτευχθεί πλήρης λύση του δείγματος).

**Σημείωση:** Ο χρόνος λύσης εξαρτάται από τον τύπο ιστού που υποβάλλεται σε επεξεργασία. Η λύση των περισσότερων ιστών ολοκληρώνεται εντός 1 ώρας. Εάν η λύση δεν έχει ολοκληρωθεί εντός 1 ώρας, γεγονός που υποδεικνύεται από την παρουσία αδιάλυτου υλικού, μπορεί να παραταθεί ο χρόνος λύσης ή να αφαιρεθεί το αδιάλυτο υλικό με φυγοκέντριση, σύμφωνα με την περιγραφή στο βήμα 16. Η λύση κατά τη διάρκεια της νύχτας επιτρέπεται και δεν επηρεάζει την προετοιμασία.

13. Επώαστε στους 90°C για 1 ώρα.

**Σημείωση:** Η επώαση στους 90°C σε ρυθμιστικό διάλυμα ATL αναστρέφει μερικώς τις τροποποιήσεις που επέφερε η φορμαλδεΰδη στα νουκλεϊκά οξέα. Οι μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης ή οι υψηλότερες θερμοκρασίες επώασης μπορούν να οδηγήσουν σε περαιτέρω κατακερματισμό του DNA. 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 90°C.

14. Φυγοκεντρίστε σύντομα το δείγμα για να απομακρύνετε σταγονίδια από την εσωτερική πλευρά του καλύμματος.

15. Για να ελαχιστοποιήσετε την περιεκτικότητα του δείγματος σε RNA, προσθέστε 2 μl RNάσης A (100 mg/ml) και επώαστε για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προτού συνεχίσετε με το βήμα 16. Αφήστε το δείγμα να επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου προτού προσθέσετε RNάση A.

16. Μεταφέρετε προσεκτικά 220 μl του διαλύματος λύσης σε σωληνάρια δείγματος που είναι συμβατά με το φορέα δειγμάτων του QIA Symphony SP.

**Σημείωση:** Εάν τα διαλύματα λύσης περιέχουν αδιάλυτο υλικό, φυγοκεντρίστε με πλήρη ταχύτητα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προτού μεταφέρετε το υπερκείμενο σε σωληνάρια δείγματος. Για τον πλήρη κατάλογο των συμβατών σωληναρίων δείγματος, βλ. [www.qiagen.com/goto/dsphanthbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphanthbooks). Συνιστούμε τη χρήση σωληναρίων των 2 ml (π.χ. Sarstedt, αρ. καταλόγου 72.693 ή 72.608).

Για τις τρέχουσες πληροφορίες άδειας και αποποιήσεις σχετικά με συγκεκριμένα προϊόντα, ανατρέξτε στο σχετικό εγχειρίδιο ή οδηγίες χρήσης του kit QIAGEN. Οι οδηγίες και τα εγχειρίδια

---

χρήσης των κιτ QIAGEN είναι διαθέσιμα στο [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ή μπορούν να ζητηθούν από το τμήμα τεχνικής υποστήριξης της QIAGEN ή από τον τοπικό σας διανομέα.

Εμπορικά σήματα: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (Όμιλος QIAGEN), Sarstedt® (Sarstedt AG and Co), ThermoMixer® (Eppendorf AG). Οι καταχωρημένες ονομασίες, τα εμπορικά σήματα κ.λπ. που χρησιμοποιούνται σε αυτό το έγγραφο, δεν θα πρέπει να θεωρούνται μη προστατευμένα από το νόμο, ακόμη και αν δεν επισημειώνονται ειδικά ως τέτοια. 08/2015 HB-0977-S01-002 © 2012–2015 QIAGEN, με την επιφύλαξη κάθε δικαιώματος.

