

Augustus 2017

Gebruiksaanwijzing (Handboek) RNeasy[®] DSP FFPE Kit



Versie 1
Voor diagnostisch gebruik in vitro

IVD Voor diagnostisch gebruik in vitro



REF 73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Duitsland

R1 **MAT** 1106945NL

Inhoud

Beoogd gebruik.....	3
Samenvatting en uitleg	3
Principes van de procedure.....	4
Meegeleverde materialen	6
Inhoud van de kit.....	6
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	7
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	8
Bewaren en hanteren van reagentia.....	10
Componenten van de kit	10
Belangrijke opmerkingen	11
Vorbereiding van buffers	12
Procedure	14
Protocol: Zuivering van totaal RNA uit FFPE-weefselcoupes.....	15
Kwaliteitscontrole.....	19
Beperkingen.....	19
Symbolen	20
Problemen oplossen	22
Bijlage: Algemene aanwijzingen voor hantering van RNA	24
Bestelgegevens.....	26

Beoogd gebruik

De RNeasy DSP FFPE Kit is een systeem voor zuivering van het totale RNA uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde weefsels (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Het product is bedoeld voor toepassing door beroepsmatige gebruikers, bijvoorbeeld analisten en artsen die zijn opgeleid in moleculair-biologische technieken.

Het hanteert een geoptimaliseerd silica-spinkolom-protocol en omvat enzymatische verwijdering van residueel DNA.

De RNeasy DSP FFPE Kit is bedoeld voor gebruik in de in-vitrodiagnostiek.

Samenvatting en uitleg

De RNeasy DSP FFPE Kit is speciaal ontworpen voor zuivering van totale RNA uit FFPE-weefselcoupes (in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed). Door RNA-moleculen langer dan 70 nucleotiden te isoleren, biedt de kit herstel van bruikbare RNA-fragmenten voor processen als RT-PCR.

Als gevolg van de fixatie- en inbeddingsomstandigheden zijn nucleïnezuren in FFPE-monsters doorgaans gefragmenteerd en chemisch gemodificeerd door formaldehyde. Derhalve hebben nucleïnezuren die zijn geïsoleerd uit FFPE-monsters vaak een lager molecuulgewicht dan nucleïnezuren uit verse of ingevroren monsters. De mate van fragmentatie is afhankelijk van het type monster, hoe oud het monster is en de gebruikte omstandigheden wat betreft fixatie, inbedding en opslag van het monster. Voor standaardisatie van processen in vooronderzoek van FFPE-weefsel raden wij aan om te werken conform de CEN-norm CEN/TS 16827-1_2015.

Hoewel formaldehydemodificatie niet kan worden gedetecteerd in standaardassays voor kwaliteitscontrole, zoals gelelektroforese of laboratorium-op-een-chip-analyse, werkt dit zeer verstrend voor enzymatische analyses.

De RNeasy DSP FFPE Kit is geoptimaliseerd om formaldehydemodificatie zo veel mogelijk teniet te doen zonder verdere RNA-afbraak. Desalniettemin dienen nucleïnezuren die zijn gezuiverd uit FFPE-monsters niet te worden gebruikt in downstreamprocessen waarbij de gehele RNA-sequentie vereist is. In sommige processen zijn wellicht modificaties vereist voor het gebruik van gefragmenteerd RNA (bijvoorbeeld de samenstelling van kleine ampliconen voor RT-PCR). Voor cDNA-synthese dienen random of genspecifieke primers te worden gebruikt in plaats van oligo-dT-primers.

Ook kan kleuring van FFPE-coupees de kwaliteit en prestaties van RNA in downstreamprocessen nadelig beïnvloeden. Dit geldt met name voor veel immunohistochemische kleuringsprotocollen

Principes van de procedure

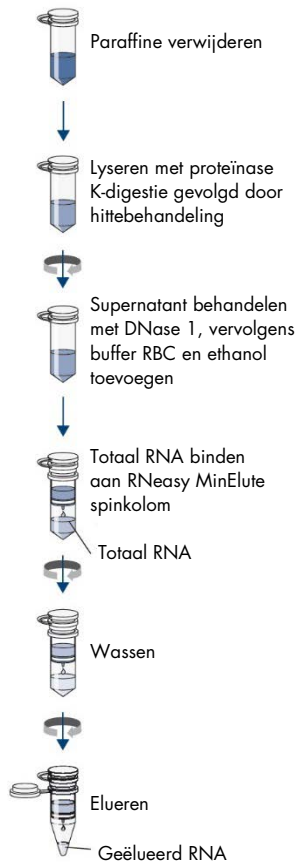
De RNeasy DSP FFPE-procedure maakt gebruik van de algemeen erkende RNeasy-technologie voor RNA-zuivering. Aan de hand van speciaal geoptimaliseerde lyseomstandigheden kan totale RNA effectief worden gezuiverd uit FFPE-weefselcoupees. In de DNase I-digestiestap wordt DNA-contaminatie op efficiënte wijze verwijderd, met inbegrip van zeer gefragmenteerde moleculen.

Eerst wordt alle paraffine verwijderd uit verse FFPE-weefselcoupees door deze te behandelen met de deparaffineeroplossing. Vervolgens worden de monsters geïncubeerd in een geoptimaliseerde lysebuffer, met daarin proteïnase K om het RNA uit de coupees te halen. Bij een korte incubatie met hogere temperatuur wordt formaline-crosslinking van de vrijgekomen nucleïnezuren gedeeltelijk omgekeerd. Dit verbetert de opbrengst en kwaliteit van het RNA, alsmede de RNA-prestaties in enzymatische downstream-assays. Dit wordt gevolgd door een DNase I-behandeling die is geoptimaliseerd voor eliminatie van genomisch DNA, met inbegrip van zeer kleine DNA-

fragmenten die vaak aanwezig zijn in FFPE-monsters na langdurige formalinefixatie en/of langdurige opslag. Vervolgens wordt het lysaat gemengd met buffer RBC. Er wordt ethanol toegevoegd om geschikte bindingsomstandigheden voor RNA te verwezenlijken. Het monster wordt vervolgens in een RNeasy MinElute spinkolom geplaatst, waarin het totale RNA aan het membraan wordt gebonden en contaminanten op efficiënte wijze worden weggespoeld. RNA wordt vervolgens geëluëerd in minimaal 14 µl RNase-vrij water.

Procedure met de RNeasy DSP FFPE

FFPE-weefselcoupes



Afbeelding 1. RNA-zuiveringsprocedure uit FFPE-weefsel met gebruik van de RNeasy DSP FFPE Kit.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

RNeasy DSP FFPE Kit			(50)
Catalogusnr.			73604
Aantal preparaten			50
	Identiteit	Symbolen	Aantal
RNeasy MinElute spin	RNeasy MinElute® Spin Columns (pink) (each in a 2 ml Collection Tube) (RNeasy MinElute® spinkolommen (roze) (elk in een collectiebuisje van 2 ml))	COL	50
ET	Elution Tubes (1.5 ml) (Elutiebuisjes (1,5 ml))	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (2 ml) (Lysebuisjes (2 ml))	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (2 ml) (Wasbuisjes (2 ml))	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution (Deparaffineeroplossing)	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC (Buffer RBC)*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD (Buffer PKD)	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (Proteïnase K)	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (lyophilized) (RNase-vrij DNase I (gevroesdroogd))	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (RNase-vrij water)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer (DNase-boosterbuffer)	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE (concentrate) (Buffer RPE (concentraat))†	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v1	RNeasy DSP FFPE Kit Handbook (Handboek RNeasy DSP FFPE Kit)		1

*Bevat een guanidinezout. Niet geschikt voor gebruik met bleekhoudende desinfectiemiddelen. Zie pagina 8 voor veiligheidsinformatie.

†Voordat u het voor het eerst gebruikt, voeg 4 volumes ethanol (96–100%, niet-gedenatureerd) toe zoals aangegeven op het flesje, en zoals beschreven op pagina 12 om een werkoplossing te verkrijgen.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de betreffende veiligheidsinformatiebladen (VIB of MSDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Verzeker u ervan dat de apparaten zijn gecontroleerd en gekalibreerd volgens de aanbevelingen van de fabrikant.

- Steriele, RNase-vrije pipettips en pipetten
- Microcentrifuge (met rotor voor buisjes van 2 ml)
- Vortex
- 100% ethanol (gebruik geen gedenatureerde alcohol, die andere substanties bevat, zoals methanol of methylethylketon)
- Wegwerphandschoenen
- Verwarmingsblok met schudfunctie waarmee incubatie bij 56 °C en 80 °C mogelijk is

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor diagnostisch gebruik in vitro.

Lees alle instructies zorgvuldig door voordat u de kit gebruikt.

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg de bijbehorende veiligheidsinformatiebladen (VIB's) voor meer informatie. Deze zijn online beschikbaar in pdf-formaat via www.qiagen.com/safety. Hier vindt u de VIB's van alle kits en kit-componenten van QIAGEN, die u kunt bekijken en afdrukken.

WAARSCHUWING Risico op lichamelijk letsel



Voeg **GEEN** bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.

Buffers in de RNeasy DSP FFPE kit bevatten natriumazide. Als u buffers uit de kit hebt gemorst, moeten die worden opgenomen met een geschikt laboratoriumreinigingsmiddel en water. Als de gemorste vloeistof potentieel infectieuze agentia bevat, reinig de verontreinigde plaats dan eerst met laboratoriumreinigingsmiddel en water, en daarna met 1% (v/v) natriumhypochloriet.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de onderdelen van de RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNF, DBB

Bevat: Natriumazide. Waarschuwing! Kan bij doorslikken schadelijk zijn. Bij onwel voelen een GIFICENTRUM of een arts raadplegen.

DSP



Bevat: hexadecaan. Gevaarlijk! Kan dodelijk zijn als de stof bij inslikken in de luchtwegen terecht komt. Herhaalde blootstelling kan een droge of een gebarsten huid veroorzaken. Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkende stortlocatie. GEEN braken opwekken. NA INSLUKKEN: onmiddellijk een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen. Achter slot bewaren.

Proteinase K



Bevat: Proteinase K. Gevaarlijk! Veroorzaakt lichte huidirritatie. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkende stortlocatie. Bij ademhalingsmoeilijkheden: een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen. NA INADEMING: bij ademhalingsmoeilijkheden het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt. Adembescherming dragen.

DNase I



Bevat: Desoxyribonuclease. Gevaarlijk! Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkende stortlocatie. Bij ademhalingsmoeilijkheden: een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen. NA INADEMING: bij ademhalingsmoeilijkheden het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt. Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen. Adembescherming dragen.

RBC



Bevat: guanidinehydrochloride. Waarschuwing! Schadelijk bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen. Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkende stortlocatie. Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.

DBB



Bevat: calciumchloride; waterstofchloride. Waarschuwing! Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Bij aanhoudende oogirritatie: een arts raadplegen. BIJ CONTACT MET DE OGEN: Voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken. BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen. Bij huidirritatie: een arts raadplegen. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.

Bewaren en hanteren van reagentia

RNase-vrij DNase I en RNeasy MinElute spinkolommen dienen onmiddellijk na aankomst te worden bewaard bij 2–8 °C. De buffers kunnen op kamertemperatuur (15–25 °C) worden bewaard. Onder dergelijke omstandigheden kan de kit worden bewaard tot de vervaldatum zoals vermeld op het etiket zonder dat de prestaties verslechteren.

Gebruik de RNeasy DSP FFPE Kit niet meer na het verstrijken van de vervaldatum.

Componenten van de kit

De vervaldatum van de verschillende reagentia staan vermeld op de etiketten van de afzonderlijke componenten. Bij de juiste bewaarcondities blijven de prestaties van het product tot de vermelde tijd stabiel zolang dezelfde partijen componenten worden gebruikt.

Voor langdurige opslag van DNase I na reconstitutie verwijdert u de voorraadoplossing uit de flacon, verdeelt u deze in aliquots voor eenmalig gebruik en bewaart u deze maximaal 9 maanden bij –15 tot –30 °C. Ontdooide aliquots kunnen maximaal 6 weken bij 2–8 °C worden bewaard. Nadat aliquots zijn ontdooid, mogen ze niet opnieuw worden ingevroren.

Vermijd blootstelling van de reagentia aan UV-licht (bijvoorbeeld wanneer dit wordt gebruikt voor decontaminatie), omdat blootstelling kan leiden tot versnelde veroudering.

Belangrijke opmerkingen

Uitgangsmateriaal

Standaardprocedures voor fixatie in formaline en inbedding in paraffine leiden altijd tot aanzienlijke fragmentatie en crosslinking van nucleïnezuren. Houd u aan het volgende om de mate van fragmentatie en crosslinking van nucleïnezuren te beperken:

- Gebruik weefselmonsters van minder dan 5 mm dik om volledige penetratie door formaline mogelijk te maken
- Fixeer weefselmonsters zo snel mogelijk na de chirurgische verwijdering in 4-10% neutraal gebufferde formaline
- Gebruik een maximale fixatietijd van 24 uur (langere fixatietijden leiden tot overfixatie en ernstigere nucleïnezuurfragmentatie, hetgeen leidt tot slechte prestaties in downstream-assays)
- Dehydrateer de monsters grondig voorafgaand aan de inbedding
- Gebruik paraffine met een laag smeltpunt voor de inbedding

Als uitgangsmateriaal voor RNA-zuivering moeten verse coupes FFPE-weefsel worden gebruikt, elk met een dikte van maximaal 20 μm . Dikkere coupes kunnen leiden tot een lagere opbrengst van nucleïnezuren, zelfs na langdurige incubatie met proteïnase K. Er kunnen maximaal 4 coupes, elk met een maximale dikte van 10 μm , worden gecombineerd in één preparaat. Er kunnen meer dan 4 coupes worden gecombineerd als de totale som van de coupediktes 40 μm of minder bedraagt (bijvoorbeeld acht coupes met een dikte van 5 μm).

Voor weefsels met een uitzonderlijk hoog DNA-gehalte raden wij aan om minder coupes per preparaat te gebruiken om DNA-contaminatie van het gezuiverde RNA te vermijden.

Als er geen informatie beschikbaar is over de aard van het uitgangsmateriaal, is het aan te raden te beginnen met niet meer dan 2 coupes tegelijk. Afhankelijk van de opbrengst en zuiverheid van het RNA kunnen eventueel maximaal 4 coupes worden gebruikt in de daaropvolgende preparaten. Als de RNeasy MinElute spinkolom echter te vol wordt geladen, kan dit de opbrengst en zuiverheid van het RNA aanzienlijk reduceren.

Vorbereiding van buffers

DNase I-voorraadoplossing prepareren

Prepareer de DNase I-voorraadoplossing door het gevriesdroogde DNase I op te lossen in 550 µl RNase-vrij water. Open de flacon niet om te voorkomen dat er DNase I verloren gaat. Injecteer RNase-vrij water in de flacon met behulp van een RNase-vrije naald en spuit. Keer de flacon om voorzichtig te mengen. Niet schudden.

In sommige gevallen kan het lijken alsof de flacon met DNase I leeg is. Dit komt door gevriesdroogd enzym dat aan het septum blijft plakken. Open de flacon niet om te voorkomen dat er DNase I verloren gaat. Los het DNase I in plaats daarvan op met behulp van een naald en spuit, zoals hieronder beschreven.

NB: DNase I is met name gevoelig voor fysieke denaturatie. De oplossing mag alleen worden gemengd door de flacon voorzichtig om te keren.

NB: Zorg ervoor dat het volledige volume RNase-vrij water in de flacon wordt geïnjecteerd.

Na het oplossen van DNase I kan er onoplosbaar materiaal achterblijven. Vanwege het productieproces kan er onoplosbaar materiaal aanwezig zijn in het gevriesdroogde DNase I. Dit heeft geen invloed op de prestaties van het DNase I.

Voor langdurige opslag van DNase I verwijdert u de voorraadoplossing uit de flacon, verdeelt u deze in aliquots voor eenmalig gebruik en bewaart u deze maximaal 9 maanden bij -15 tot -30 °C. Ontdooide aliquots kunnen maximaal 6 weken bij $2-8$ °C worden bewaard. Nadat aliquots zijn ontdooid, mogen ze niet opnieuw worden ingevroren.

Buffer RPE prepareren

Voeg 4 volumes (44 ml) ethanol (96-100%) toe aan het flesje met 11 ml buffer RPE-concentraat. Vink het vakje op het etiket van het flesje aan, om aan te geven dat de ethanol is toegevoegd.

NB: Schud de gereconstitueerde buffer RPE voor het begin van de procedure om hem te mengen.

Procedure

Wat u moet weten voor u begint

- Als u de RNeasy DSP FFPE Kit voor de eerste keer gebruikt, dient u de “Belangrijke opmerkingen” (pagina 11) te lezen
- Als u voor de eerste keer met RNA werkt, dient u “Bijlage: Algemene aanwijzingen voor hantering van RNA” (pagina 24) te lezen.
- Buffer RBC bevat een guanidinezout en is derhalve niet geschikt voor gebruik met bleekhoudende desinfectiemiddelen. Zie pagina 8 voor veiligheidsinformatie.
- Voer alle stappen van de procedure uit bij kamertemperatuur (15–25 °C), tenzij anders wordt aangegeven. Werk vlot door tijdens de procedure en stop niet tussendoor.
- Voer alle centrifugeerstappen uit met een microcentrifuge die is ingesteld op 15–25 °C. Bij gebruik van een gekoelde microcentrifuge stelt u de temperatuur in op 20–25 °C. Anders kan onder 15 °C significante koeling plaatsvinden.
- In de onderstaande procedure duidt ▲ op de te gebruiken volumes bij verwerking van 1–2 coupes per monster. ● duidt op de te gebruiken volumes bij verwerking van >3–4 coupes per monster.
- Als u buffer RPE en RNase-vrij DNase I voor de eerste keer gebruikt, reconstitueer deze dan zoals beschreven in “Voorbereiding van buffers” (pagina 12)
- Laat alle buffers op kamertemperatuur komen (15–25 °C). Meng gereconstitueerde buffer RPE door te schudden.
- Stel een thermische mixer in op 56 °C om te gebruiken in stap 5 en stap 9. Stel een tweede thermische mixer in op 80 °C voor gebruik in stap 9 om de wachttijd te verlagen.
- NB: Stop de zuiveringsprocedure niet tussendoor, aangezien een langere incubatieduur kan leiden tot verlies of verslechtering van RNA. De gemiddelde verwerkingsduur van maximaal 12 monsters tegelijkertijd bedraagt ongeveer 130 minuten.

Protocol: Zuivering van totaal RNA uit FFPE-weefselcoupes

1. Snijd met een scalpel eventuele overmaat aan paraffine van het monsterblok.
2. Snijd coupes met een dikte van 5–20 μm .

Als het monsteroppervlak is blootgesteld aan lucht, moeten de eerste 2–3 coupes worden weggegooid.
3. Plaats de coupes onmiddellijk in een microcentrifugebuisje van ▲ 1,5 ml of ● 2 ml en sluit het deksel.
4. Voeg ▲ 160 μl of ● 320 μl deparaffineeroplossing toe, schud 10 seconden krachtig en centrifugeer kort, zodat het monster naar de bodem van het busje zakt.
5. Incubeer bij 56 °C gedurende 3 minuten en laat het vervolgens 5 minuten afkoelen bij kamertemperatuur.

Als er te weinig deparaffineeroplossing wordt gebruikt of als er te veel paraffine samen met het monster wordt overgebracht, kan de deparaffineeroplossing na het afkoelen wasachtig worden of een vaste vorm aannemen. Als dit gebeurt, voegt u extra deparaffineeroplossing toe in stappen van 160 μl en herhaalt u stap 5.
6. Voeg ▲ 150 μl of ● 240 μl buffer PKD toe en meng dit door 3 seconden te schudden.
7. Centrifugeer gedurende 1 minuut bij 11.000 $\times g$.
8. Voeg 10 μl proteïnase K toe in de laagste, heldere fase en meng dit door voorzichtig 10 keer op en neer te pipetteren (meng de gescheiden fasen niet).
9. Incubeer bij 56 °C en 1100 rpm gedurende 15 minuten en vervolgens bij 80 °C en 1100 rpm gedurende 15 minuten.

Als er slechts één verwarmingsblok wordt gebruikt, zet het monster dan bij kamertemperatuur na de incubatie bij 56 °C tot het verwarmingsblok op 80 °C is gekomen.

NB: Volledige digestie van weefsel door proteïnase K is niet vereist voor een maximale RNA-opbrengst, maar de incubatiestap bij 80 °C is essentieel.

BELANGRIJK: Controleer of het verwarmingsblok een temperatuur van 80 °C heeft bereikt voordat de incubatie van 15 minuten wordt gestart. De incubatie van 15 minuten bij 80 °C is essentieel voor omkering van formaldehyde-crosslinks en optimale RNA-prestaties in downstreamprocessen, zoals real-time RT-PCR.

10. Centrifugeer kort en breng ▲ 145 µl of ● 230 µl van de laagste, ongekleurde fase over naar een nieuw microcentrifugebuisje van 1,5 ml.

11. Incubeer op ijs gedurende 3 minuten. Centrifugeer vervolgens gedurende 15 minuten bij 20.000 x g.

12. Breng de supernatant over naar een nieuw microcentrifugebuisje van 2 ml. Let hierbij op dat het pellet niet wordt verstoord.

Het pellet bevat onoplosbaar weefselafval, met inbegrip van gecrosslinkt DNA.

13. Voeg DNase-boosterbuffer equivalent aan een tiende van het totale monstervolume (▲ 14,5 µl of ● 23 µl) en 10 µl DNase I-voorraadoplossing toe. Meng door het busje om te keren. Centrifugeer kort om resterende vloeistof aan de zijden van het busje te verzamelen.

NB: DNase I wordt gevriesdroogd geleverd en moet worden gereconstitueerd zoals beschreven in "DNase I-voorraadoplossing prepareren", pagina 12.

NB: DNase I is met name gevoelig voor denaturatie. De oplossing mag alleen worden gemengd door het busje voorzichtig om te keren. Niet schudden.

14. Incubeer bij kamertemperatuur gedurende 15 minuten.

15. Voeg ▲ 320 µl of ● 500 µl buffer RBC toe om de bindingsomstandigheden aan te passen. Meng het lysaat grondig door gedurende 3 seconden te schudden en centrifugeer kort.

16. Voeg ▲ 720 µl of ● 1200 µl ethanol (100%) toe aan het monster. Centrifugeer niet. Ga onmiddellijk verder met stap 17.

Na het toevoegen van ethanol kunnen precipitaten zichtbaar zijn. Dit is niet van invloed op de procedure.

17. Meng goed door 5 keer op en neer te pipetteren en breng 700 µl van het monster, met inbegrip van eventueel gevormd precipitaat, over naar een RNeasy MinElute spinkolom die in een collectiebuisje van 2 ml is geplaatst. Sluit het deksel voorzichtig en centrifugeer gedurende 15 seconden bij $\geq 8.000 \times g$. Gooi het collectiebuisje met de flow-through* weg en plaats de kolom in een nieuw collectiebuisje (meegeleverd).
18. Herhaal stap 17 (zonder extra mengen) tot het gehele monster door de RNeasy MinElute spinkolom is gegaan.
19. Voeg 500 µl buffer RPE toe aan de RNeasy MinElute spinkolom. Sluit het deksel voorzichtig en centrifugeer gedurende 15 seconden bij $\geq 8.000 \times g$. Gooi het collectiebuisje met de flow-through* weg en plaats de kolom in een nieuw collectiebuisje (meegeleverd).
- NB: Buffer RPE wordt meegeleverd als concentraat. Controleer of ethanol voorafgaand aan gebruik is toegevoegd, zoals beschreven in "Buffer RPE prepareren".
20. Voeg 500 µl buffer RPE toe aan de RNeasy MinElute spinkolom. Sluit het deksel voorzichtig en centrifugeer gedurende 2 minuten bij $\geq 8.000 \times g$ om het membraan van de spinkolom te wassen. Gooi het collectiebuisje met de flow-through* weg en plaats de kolom in een nieuw collectiebuisje (meegeleverd).
- NB:** Verwijder de RNeasy MinElute spinkolom na de centrifugatie voorzichtig uit het collectiebuisje, op zo'n manier dat de kolom niet in contact komt met de flow-through. Anders kan ethanol worden overgedragen.

* De flow-through bevat buffer RBC en is derhalve niet geschikt voor gebruik met bleekmiddel. Zie pagina 8 voor veiligheidsinformatie.

21. Open het deksel van de spinkolom en centrifugeer gedurende 5 minuten bij maximumsnelheid. Gooi het collectiebuisje met de flow-through weg.

Plaats de spinkolommen in de centrifuge met minstens één lege plaats tussen de kolommen om beschadiging van de deksels te voorkomen. Plaats de deksels zodanig dat ze in een andere richting wijzen dan de rotatie van de rotor (dus als de rotor rechtson draait, moeten de deksels linksom worden gericht).

Het is van belang dat het membraan van de spinkolom wordt gedroogd, aangezien achtergebleven ethanol een belemmering kan vormen voor downstream-reacties. Centrifugeren met geopende deksels garandeert dat er geen ethanol wordt overgedragen tijdens RNA-elutie.

22. Plaats de RNeasy MinElute spinkolom in een nieuw collectiebuisje van 1,5 ml (meegeleverd). Voeg 14–32 µl RNase-vrij water direct in het midden van het membraan van de spinkolom toe. Sluit het deksel voorzichtig en centrifugeer gedurende 1 minuut bij maximumsnelheid om het RNA te elueren.

Elutie met een kleiner volume RNase-vrij water leidt tot een hogere totale RNA-concentratie, maar een lagere RNA-opbrengst.

NB: Als een lage RNA-opbrengst wordt verwacht, wordt een Low Bind-buisje aanbevolen voor elutie (niet meegeleverd). Het gemiddelde dode volume van de RNeasy MinElute spinkolom bedraagt 2 µl: elutie met 14 µl RNase-vrij water leidt tot ongeveer 12 µl eluaat.

23. Bewaar RNA-eluaat maximaal 8 weken bij –60 tot –90 °C of bij –15 tot –30 °C.

Kwaliteitscontrole

Elke partij RNeasy DSP FFPE Kit wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest op vooraf vastgestelde specificaties, om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Beperkingen

De systeemprestaties zijn vastgesteld in kwaliteitsbeoordelings-onderzoeken, waarbij menselijk RNA is gezuiverd uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde monsters.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de werking van het systeem te valideren voor procedures die in het eigen lab worden gebruikt en die niet zijn opgenomen in de kwaliteitsbeoordelings-onderzoeken van QIAGEN.

Om het risico van een negatieve invloed op de diagnostische resultaten zo klein mogelijk te houden, dienen goede controles voor downstream-toepassingen te worden gebruikt.

Diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen.

Symbolen

De symbolen in de volgende tabel worden in deze gebruiksaanwijzing gebruikt.



<N>

Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties



Uiterste gebruiksdatum



Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek



Bij aankomst



DN



RNeasy MinElute spin



Catalogusnummer



Partijnummer



Materiaalnummer (m.b.t. labeling van componenten)



Componenten (d.w.z. een lijst met wat in de verpakking zit)

CONT

Bevat (inhoud)

NUM

Aantal (m.b.t. flacons, flessen)

GTIN

Artikelnummer wereldhandel (global trade item number)

Rn

“R” staat voor de revisie van de gebruiksaanwijzing (Handboek); “n” is het revisienummer



Temperatuurbeperving



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Voorzichtig

PROTK

Proteïnase K

Sodium azide

Natriumazide

Problemen oplossen

Dit gedeelte kan nuttig zijn bij het oplossen van eventuele problemen. Raadpleeg voor meer informatie ook de lijst met veelgestelde vragen in ons centrum voor technische ondersteuning: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. De wetenschappers bij de afdeling Technical Services van QIAGEN beantwoorden altijd graag uw vragen over de informatie en/of protocollen in deze handleiding of over sample- en assaytechnologieën (ga voor contactgegevens naar www.qiagen.com).

Opmerkingen en suggesties

Verstopte RNeasy MinElute spinkolom

- | | | |
|----|----------------------------------|---|
| a) | Te veel uitgangsmateriaal | Verminder de hoeveelheid uitgangsmateriaal. Het is essentieel dat de juiste hoeveelheid uitgangsmateriaal wordt gebruikt (zie pagina 11). |
| b) | Centrifugatietemperatuur te laag | De centrifugatietemperatuur moet in het bereik van 15–25 °C liggen. Sommige centrifuges kunnen afkoelen tot onder 15 °C, zelfs wanneer deze zijn ingesteld op 20 °C. Dit kan leiden tot vorming van precipitaten waardoor de RNeasy MinElute spinkolom verstopt kan raken. Als dit gebeurt, moet de centrifugatietemperatuur worden ingesteld op 25 °C. |

Lage RNA-opbrengst

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Uitgangsmateriaal van slechte kwaliteit | Monsters die langer dan 24 uur zijn gefixeerd of zeer langdurig zijn bewaard, kunnen zeer weinig bruikbaar RNA bevatten. Coupes die op een microscoopglasje zijn aangebracht, kunnen zeer weinig bruikbaar RNA opleveren vanwege langdurige blootstelling aan lucht. |
| b) | Te veel uitgangsmateriaal | Als de RNeasy MinElute spinkolom te vol wordt geladen, kan dit de opbrengst van nucleïezuren aanzienlijk reduceren. Verminder de hoeveelheid uitgangsmateriaal (zie pagina 11). |
| c) | RNA nog steeds gebonden aan membraan van RNeasy MinElute spinkolom | Herhaal de RNA-elutie, maar incubeer de RNeasy MinElute spinkolom op het werkkoppervlak gedurende 10 minuten met RNFW voorafgaand aan de centrifugatie. |
| d) | Verkeerde opslag van buffers/reagentia | RNeasy MinElute spinkolommen en DNase I moeten na ontvangst van de kit worden bewaard bij 2–8 °C. Controleer de juiste opslagtemperatuur. Blootstelling aan hogere temperaturen gedurende langere tijd kan leiden tot verlies van functionaliteit. |

Opmerkingen en suggesties

Lage A_{260}/A_{280} -waarde

- a) Water gebruikt voor verdunning van nucleïnezuur voor A_{260}/A_{280} -meting
- Gebruik 10 mM Tris Cl, pH 7,5, geen water, om het monster te verdunnen voordat de zuiverheid wordt gemeten.

DNA-contaminatie in downstream-experimenten

- a) Te veel uitgangsmateriaal
- Voor bepaalde weefseltypen kan de efficiëntie van de DNA-verwijdering minder zijn wanneer zeer grote hoeveelheden worden verwerkt. Als het geëluëerde RNA aanzienlijke DNA-contaminatie bevat, probeer dan minder weefselcoupes per preparaat te verwerken
- b) Weefsel heeft hoog DNA-gehalte
- Wanneer zeer grote hoeveelheden DNA-rijk weefsel worden verwerkt (zoals de thymus), wordt het DNA mogelijk niet volledig afgebroken. Herhaal de zuiveringsprocedure met gebruik van minder weefselcoupes. Controleer of het DNase I op juiste wijze is bewaard, zoals beschreven in "Bewaren en hanteren van reagentia" en "DNase I-voorraadoplossing prepareren".
- c) Reverse-transcriptie met onvoldoende hoeveelheid RNA
- De meeste reverse-transcriptases zijn bedoeld voor gebruik met ongeveer 1 µg RNA. Als reverse-transcriptie wordt uitgevoerd met zeer kleine hoeveelheden RNA, raden wij aan een reverse-transcriptase te gebruiken die speciaal ontworpen is voor zeer gevoelige reverse-transcriptie.

RNA presteert niet goed in downstream-assays/processen

- a) RNA gefragmenteerd of geblokkeerd vanwege formaldehydemodificatie
- De incubatie bij 80 °C in de RNeasy DSP FFPE-procedure is essentieel voor optimale RNA-prestaties in reverse-transcriptie en andere enzymatische downstreamprocessen. Zorg ervoor dat de incubatietemperatuur gehandhaafd blijft op 80 °C gedurende de gehele incubatieduur van 15 minuten. Hoewel tijdens de incubatie bij 80 °C enkele formaldehydemodificaties worden verwijderd, vormt RNA dat is gezuiverd uit FFPE-coupes geen optimale template voor enzymatische reacties. Wij raden aan uitsluitend random primers of genspecifieke primers te gebruiken voor cDNA-synthese. Daarnaast raden wij aan om ampliconen zo kort mogelijk te houden voor PCR (<500 nucleotiden).
- b) Overdracht van ethanol
- Tijdens de tweede wassing met buffer RPE dient u gedurende 2 minuten te centrifugeren bij $\geq 8.000 \times g$ en bij 15–25 °C om het membraan van de RNeasy MinElute spinkolom te drogen. Verwijder de kolom na de centrifugatie voorzichtig uit het collectiebuisje, op zo'n manier dat de kolom niet in contact komt met de flow-through. Plaats de kolom vervolgens in een nieuw collectiebuisje en centrifugeer gedurende 5 minuten bij maximumsnelheid.
- c) Overdracht van zout tijdens RNA-elutie
- Controleer of buffer RPE is gereconstitueerd door het juiste volume ethanol toe te voegen en of de buffer op kamertemperatuur (15–25 °C) is.
- d) Reverse-transcriptie met onvoldoende hoeveelheid RNA
- De meeste reverse-transcriptases zijn bedoeld voor gebruik met ongeveer 1 µg RNA. Als reverse-transcriptie wordt uitgevoerd met zeer kleine hoeveelheden RNA, raden wij aan een reverse-transcriptase te gebruiken die speciaal ontworpen is voor zeer gevoelige reverse-transcriptie.

Bijlage: Algemene aanwijzingen voor hantering van RNA

RNA hanteren

Ribonucleases (RNases) zijn zeer stabiele en actieve enzymen die voor hun werking over het algemeen geen cofactoren nodig hebben. Omdat RNases moeilijk te inactiveren zijn en zelfs minieme hoeveelheden voldoende zijn om RNA te vernietigen, dient uitsluitend kunststof of glaswerk te worden gebruikt waarbij eerst mogelijke RNase-contaminatie is geëlimineerd. Er moet zorgvuldig worden gecontroleerd of er niet onbedoeld RNases in het RNA-monsters terecht zijn gekomen tijdens of na de zuiveringsprocedure. Om een RNase-vrije omgeving te creëren en te handhaven, moeten de volgende voorzorgsmaatregelen worden getroffen tijdens de voorbehandeling en bij het gebruik van wegwerpbaar en herbruikbaar reservoirs en oplossingen terwijl u met RNA werkt.

Algemeen werk

Bij het werken met RNA moet altijd de juiste microbiologische, aseptische techniek worden toegepast. Op de handen en op stofdeeltjes kunnen bacteriën en schimmels aanwezig zijn; dit zijn de meest voorkomende bronnen van RNase-contaminatie. Draag altijd latex of vinyl handschoenen bij het hanteren van reagentia en RNA-monsters om RNase-contaminatie vanaf de huid of door stof van laboratoriumapparatuur te voorkomen. Trek regelmatig schone handschoenen aan en houd alle buisjes gesloten wanneer mogelijk. Bewaar gezuiverd RNA op ijs wanneer aliquots worden gepipetteerd voor downstreamprocessen.

Voor het verwijderen van RNase-contaminatie van werkoppervlakken, herbruikbaar kunststof benodigdheden en laboratoriumapparatuur (zoals pipetten en elektroforesetanks), wordt het gebruik van RNaseZap® (cat.nr. AM9780) van Ambion® aanbevolen. RNase-contaminaties kunnen ook worden verwijderd met gebruik van algemene laboratoriumreagentia. Voor ontsmetting van kunststof benodigdheden moet u spoelen met 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA gevolgd door RNase-vrij water (zie "Oplossingen", pagina 25), of spoelen met chloroform

als de kunststof benodigdheden bestand zijn tegen chloroform. Voor ontsmetting van elektroforesetanks moet u reinigen met een reinigingsmiddel (zoals 0,5% SDS), spoelen met RNase-vrij water, spoelen met ethanol (als de tanks bestand zijn tegen ethanol) en laten drogen.

Wegwerpbare kunststof benodigdheden

Het gebruik van steriele, wegwerpbare polypropyleen buisjes wordt in de gehele procedure aanbevolen. Dergelijke buisjes zijn over het algemeen RNase-vrij en vereisen geen voorbehandeling voor inactivering van RNases.

Glaswerk

Glaswerk moet voorafgaand aan het gebruik worden behandeld om te garanderen dat het RNase-vrij is. Glaswerk dat wordt gebruikt voor RNA-werkzaamheden moet voorafgaand aan het gebruik worden gereinigd met een reinigingsmiddel, grondig worden gespoeld en gedurende minstens 4 uur ('s nachts als dit handiger is) in de oven worden gebakken bij 240 °C. Alleen autoclaveren is niet voldoende om veel RNases volledig te inactiveren. Glaswerk kan ook worden behandeld met DEPC (diëthylpyrocarbonaat), zoals hieronder beschreven in "Oplossingen".

Oplossingen

Oplossingen (water en overige oplossingen) moeten worden behandeld met 0,1% DEPC. DEPC is een sterke, maar niet absolute, remmer van RNases. Het wordt vaak gebruikt in een concentratie van 0,1% voor inactivering van RNases op kunststof of glaswerk of om RNase-vrije oplossingen en water te maken. DEPC inactieveert RNases aan de hand van covalente modificatie. Voeg 0,1 ml DEPC toe aan 100 ml van de te behandelen oplossing en schud krachtig om het DEPC in de oplossing te mengen. Laat de oplossing gedurende 12 uur incuberen bij 37 °C. Autoclaveer vervolgens gedurende 15 minuten om sporen van DEPC te verwijderen. DEPC reageert met primaire aminen en kan niet direct worden toegepast voor behandeling van Tris-buffers. DEPC is zeer instabiel bij aanwezigheid van Tris-buffers en ontbindt snel in ethanol en CO₂. Wanneer u Tris-buffers prepareert, behandel water dan

eerst met DEPC en los Tris vervolgens op om de juiste buffer te maken. Spoorhoeveelheden DEPC zorgen voor modificatie van purineresten in RNA aan de hand van carbethoxylatie. Gecarbethoxyleerd RNA wordt met zeer lage efficiëntie omgezet in celvrije systemen. Het vermogen om DNA:RNA- of RNA:RNA-hybriden te vormen wordt desalniettemin niet ernstig beïnvloed, tenzij een groot deel van de purineresten is gemodificeerd. Achtergebleven DEPC moet altijd worden geëlimineerd uit oplossingen en reservoirs door middel van autoclaveren of verhitting tot 100 °C gedurende 15 minuten.

NB: RNeasy-buffers zijn gegarandeerd RNase-vrij zonder DEPC-behandeling en zijn derhalve vrij van DEPC-contaminaties.

Bestelgegevens

Product	Inhoud	Cat.nr.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute spinkolommen, elutiebusjes, wasbusjes, lysebusjes, RNase-vrije reagentia en buffers	73604

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende 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.

Opmerkingen

Opmerkingen

Beperkte licentieovereenkomst voor de RNeasy DSP FFPE Kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in de kit bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van deze kit te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij de kit zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die verkrijgbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd aan QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat deze kit en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Deze kit en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van de kit gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen, en niemand anders toestaan stappen te ondernemen, die kunnen leiden tot enige handeling die hierboven als verboden is vermeld, of die dergelijke handelingen mogelijk maken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten verhalen, inclusief advocaatkosten, bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met de kit en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie voor bijgewerkte licentievoorwaarden www.qiagen.com.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific of dochterondernemingen). 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.

08/2017 HB-2416-001 1106945 © 2012–2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

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