

Augusti 2017

Bruksanvisning till RNeasy[®] DSP FFPE (handbok)



Version 1
För in vitro-diagnostisk användning

IVD För in vitro-diagnostisk användning



REF 73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Tyskland

R1 **MAT** 1106945SV

Innehåll

Avsedd användning	3
Sammanfattning och förklaring	3
Användningsprinciper	4
Material som medföljer	6
Kitets innehåll	6
Material som behövs men inte medföljer	7
Varningar och försiktighet	8
Förvaring och hantering av reagenser	10
Kitkomponenter	10
Viktiga anmärkningar	11
Beredning av buffertar	12
Procedur	13
Protokoll: Rening av Total RNA från FFPE-vävnadsnitt	14
Kvalitetskontroll	17
Begränsningar	17
Symboler	18
Felsökningshandbok	20
Bilaga: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering	22
Beställningsinformation	24

Avsedd användning

RNeasy DSP FFPE Kit är ett system som är avsett för rening av total-RNA från formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad (formalin-fixed, paraffin embedded; FFPE).

Produkten är avsedd att användas av yrkesanvändare, t.ex. laboratorietekniker och läkare som är utbildade i molekylärbiologiska tekniker.

Den använder ett optimerat silika-spinnkolonnbaserat protokoll och inkluderar enzymatiskt avlägsnande av kvarblivet DNA.

The RNeasy DSP FFPE Kit är avsett för in vitro-diagnostisk användning.

Sammanfattning och förklaring

RNeasy DSP FFPE Kit är specifikt avsett för rening av total-RNA från formalinfixerad, paraffinbäddad vävnad (FFPE). Genom att isolera RNA-molekyler som är längre än 70 nukleotider är det möjligt att använda satsen för att samla in användbara RNA-fragment för tillämpningar som RT-PCR.

På grund av fixerings- och inbäddningsförutsättningarna är nukleinsyror i FFPE-prover ofta fragmenterade och kemiskt förändrade av formalin. Därför har nukleinsyror från FFPE-prover ofta lägre molekylär massa än de som hämtas från färsk eller frysta prover. Graden av fragmentering beror på provets typ och ålder samt förutsättningarna för fixering, inbäddning och förvaring av provet. För standardisering av förundersökningsrutiner för FFPE-vävnad rekommenderar vi CEN-standarden CEN/TS 16827-1_2015.

Formelinmodifiering kan inte upptäckas i vanliga kvalitetskontrollanalyser, till exempel elektrofores eller labb-på-ett-chip-analys, men det inverkar kraftigt på enzymatiska analyser.

Medan RNeasy DSP FFPE Kit har optimerats för att återställa formalinmodifieringen så mycket som möjligt utan vidare RNA-degradering bör nukleinsyror som har renats från FFPE-prover inte användas i senare tillämpningar som kräver fullängds-RNA. Vissa tillämpningar kan kräva modifieringar för att möjliggöra användning av fragmenterad RNA (till exempel utformning av små amplikoner för RT-PCR). För cDNA-syntes kan antingen slumpmässiga eller genspecifika primers användas istället för oligo-dT-primers.

Färgning av FFPE-snitt kan också försämra RNA-kvalitet och -prestanda i nedströmstillämpningar. Detta är särskilt sant för många immunhistokemiska färgningsprotokoll

Användningsprinciper

Rutiner för RNeasy DSP FFPE använder välbeprövad RNeasy-teknik för RNA-rening. Särskilt optimerade lyseringsförutsättningar gör att RNA kan renas effektivt från FFPE-vävnadsnitt. Bearbetningssteget DNase I tar effektivt bort DNA-kontaminering, inklusive mycket fragmenterade molekyler.

Först avlägsnas allt paraffin från nyklippta FFPE-vävnadsnitt genom att behandla dem med en paraffinborttagningslösning. Därefter inkuberas proverna i en optimerad lyseringsbuffert som innehåller proteinas K, så att RNA frigörs från snitten. En kort inkubering vid högre temperatur återställer delvis paraffinorsakad korsbindning av de frisläppta nukleinsyror, vilket förbättrar mängden och kvaliteten av RNA, samt RNA-prestandan i enzymatiska nedströmstillämpningar. Detta följs av DNase I-behandling som har optimerats för att eliminera genom-DNA, inklusive mycket små DNA-fragment som ofta förekommer i FFPE-prover efter långvarig formalinfixering och/eller lång förvaringstid. Därefter blandas lysatet med Buffert-RBC. Etanol tillsätts för att skapa lämpliga bindningsförutsättningar för RNA och provet tillämpas sedan i en RNeasy MinElute-spinncolonn, där total-RNA binds till membranet och föroreningar effektivt sköljs bort. RNA elueras sedan i minst 14 µ RNase-fritt vatten.

RNeasy DSP FFPE-procedur

FFPE-vävnadsnitt

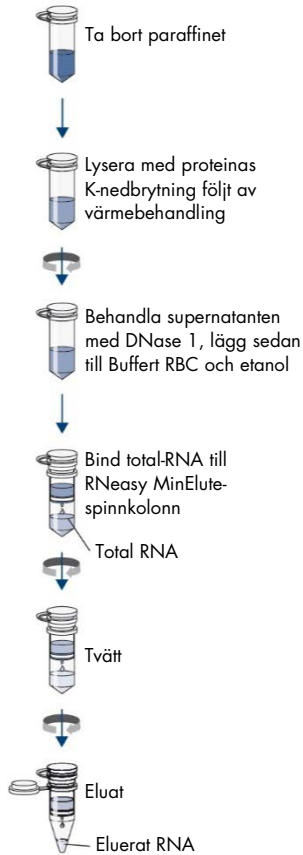


Bild 1. RNA-reningsrutin från FFPE-vävnad med RNeasy DSP FFPE Kit.

Material som medföljer

Kitets innehåll

RNeasy DSP FFPE Kit		(50)	
Katalognr.		73604	
Antal beredningar		50	
	Identitet	Symboler	Kvantitet
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® spinnkolonner (rosa) (varje i ett 2 ml uppsamlingsrör)	COL	50
ET	Elution Tubes (Elueringsrör) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lyseringsrör (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Tvättrör) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution (paraffinborttagande lösning)	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC (RBC-buffert)*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD (PKD-buffert)	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinas K	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (lyofiliserad)	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (Vatten, fritt från RNase)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster-buffert	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE (RPE-buffert)† (koncentrat)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v1	Bruksanvisning för RNeasy DSP FFPE Kit		1

* Innehåller guanidinsalt. Inte kompatibel med desinfektionsmedel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 8.

†Tillsätt 4 volymer etanol (96-100 %, ej denaturerad) innan det används för första gången enligt anvisningarna på flaskan och sidan 12. På så sätt erhålls en arbetslösning.

Material som behövs men inte medföljer

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Se lämpliga säkerhetsdatablad från produktleverantören för materialsäkerhet.

Kontrollera att instrumenten har kontrollerats och kalibrerats enligt tillverkarens instruktioner.

- Steril, RNase-fria pipettspetsar och pipetter
- Mikrocentrifug (med rotor för 2 ml provrör)
- Vortexblandare
- 100 % etanol (använd inte denaturerad alkohol som innehåller andra substanser såsom metanol eller metyletylketon)
- Engångshandskar
- Värmeblock med skakfunktion som kan inkubera på 56 C och 80 C

Varningar och försiktighet

För in vitro-diagnostisk användning.

Läs alla anvisningar noga innan du använder kitet.

Använd alltid laboratorierock, engångshandskar och skyddsglasögon vid hantering av kemikalier. Ytterligare information finns i aktuella säkerhetsdatablad för materialsäkerhet. Dessa är tillgängliga online i pdf-format på www.qiagen.com/safety där du kan hitta, granska och skriva ut datablad för alla kit och kitkomponenter från QIAGEN.

VARNING

Risk för personskada



Tillsätt ALDRIG blekmedel eller sura lösningar direkt till provavfallet.

Buffertar i RNeasy FSP FFPE-satsen innehåller natriumazid. Om dessa buffertar spills rengör du med lämpligt laboratorierengöringsmedel och vatten. Om den spillda vätskan innehåller potentiellt smittfarliga ämnen rengör du det påverkade området först med laboratorierengöringsmedel och vatten och sedan med natriumhypoklorit 1 % (v/v).

Följande risk- och skyddsfraser (R- och S-fraser) gäller för komponenterna i RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNFW, DBB

Innehåller: Natriumazid. Varning! Kan vara skadligt vid förtäring. Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du mår illa.

DSP



Innehåller: hexadekan. Fara! Kan vara dödligt vid förtäring om det kommer ner i luftvägarna. Upprepad kontakt kan ge torr hud eller hudsprickor. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. Framkalla INTE kräkning. VID FÖRTÄRING: Kontakta genast GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. Förvaras inlåst.

Proteinas K



Innehåller: Proteinas K. Fara! Orsakar lindrig hudirritation. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. VID INANDNING: Vid andningsbesvär, flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen. Använd andningsskydd.

DNase I



Innehåller: Desoxyribonukleas. Fara! Kan orsaka allergisk hudreaktion. Kan orsaka allergi- eller astmasymptom eller andningssvårigheter vid inandning. Inandas inte damm/rök/gaser/dimma/ångor/sprej. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. Vid besvär i luftvägarna: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare. VID INANDNING: Vid andningsbesvär, flytta personen till frisk luft och se till att han eller hon vilar i en ställning som underlättar andningen. Nedstänkta kläder tas av och tvättas innan de används igen. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. Använd andningsskydd.

RBC



Innehåller guanidinhydroklorid. Varning! Skadligt vid förtäring eller inandning. Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du mår dåligt. Innehållet/behållaren lämnas till en godkänd avfallsanläggning. Nedstänkta kläder tas av och tvättas innan de används igen. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

DBB



Innehåller: kalciumklorid; väteklorid Varning! Irriterar huden. Orsakar allvarlig ögonirritation. Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. Nedstänkta kläder tas av och tvättas innan de används igen. VID HUDKONTAKT: Tvätta försiktigt med mycket tvål och vatten. Vid hudirritation: Sök läkarhjälp. Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.

Förvaring och hantering av reagenser

RNase-fri DNase I och RNeasy MinElute-spinnkolonner bör förvaras i 2-8 °C omedelbart efter mottagande. Buffertar kan förvaras i rumstemperatur (15-25 °C). Under sådana förutsättningar kan kitet förvaras tills utgångsdatumet på förpackningsetiketten utan försämrad funktion.

Använd inte RNeasy DSP FFPE Kit efter dess utgångsdatum.

Kitkomponenter

Utgångsdatum för reagenserna anges på etiketterna till varje enskild produkt. Vid förvaring under de angivna förvaringsvillkoren har produkten full prestanda under hela stabilitetstiden så länge komponenter från samma batchar används.

För långtidsförvaring av DNase I efter rekonstituering ska du ta bort lösningen från ampullen, fördela den i engångsalikvoter och förvara i -15 till -30 °C i upp till 9 månader. Tinade alikvoter kan förvaras i 2-8 °C i upp till 6 veckor. Frys inte ner upptinade alikvoter.

Undvik att utsätta reagenserna för UV-ljus (t.ex. vid sanering) eftersom denna exponering kan påskynda åldrandet.

Viktiga anmärkningar

Startmaterial

Standardprocedurer för formalinfixering och paraffininbäddning leder alltid till betydande fragmentering och korsbindning av nukleinsyror. Begränsa omfattningen av nukleinsyrefragmentering och korsbindning genom att:

- Använda vävnadsprover som är mindre än 5 mm tjocka för att tillåta full formalinpenetrering
- Fixera vävnadsprover i 4–10 % formalin med neutral buffert snarast möjligt efter kirurgisk provtagning
- Använd en högsta fixeringstid på 24 timmar (längre fixeringstider leder till överfixering och allvarligare DNA-fragmentering, vilket ger dålig prestanda vid nedströmsanalyser)
- Torka proverna noggrant för inbäddning
- Använd lågsmältande paraffin för inbäddning

Startmaterial för RNA-rening ska vara färsk snitt av FFPE-vävnad med en tjocklek på upp till 20 μm . Tjockare snitt kan leda till lägre mängd nukleinsyror, till och med efter lång inkubering med proteinas K. Upp till 4 snitt, var och ett med en tjocklek på upp till 10 μm kan kombineras i en beredning. Mer än 4 snittkan kombineras om totalsumman av snitten är 40 μm eller mindre (till exempel 5 μm tjocka snitt).

För vävnad med särskilt högt DNA-innehåll rekommenderar vi färre snitt per beredning för att undvika DNA-kontaminering av renat RNA.

Om du saknar information om startmaterialets egenskaper rekommenderar vi att du börjar med högst 2 snitt i ett preparat. Beroende på RNA-mängd och -renhet, kan det vara möjligt att använda upp till 4 snitt i påföljande preparat. Men överbelastning av RNeasy MinElute-spinnkolonnen kan avsevärt minska mängden och kvaliteten på RNA.

Beredning av buffertar

Beredning av DNase I standardlösning

Bered DNase I-standardlösning genom att lösa lyofiliserat DNase I i 550 µl RNase-fritt vatten. För att undvika förlust av DNase I ska du inte öppna ampullen. Injicera RNase-fritt vatten i ampullen med en RNase-fri nål och kanyl. Blanda försiktigt genom att vända ampullen. En vortex bör inte användas för att blanda.

I vissa fall kan ampullen med DNase I verka tom. Detta beror på att lyofiliserat enzym fastnar i avfallet. För att undvika förlust av DNase I ska du inte öppna ampullen. Lös istället DNase I med en nål och kanyl enligt nedanstående beskrivning.

Obs: DNase I (RNFD) är mycket känslig för fysikalisk denaturering. Blanda DNase I (RNFD)-lösningen försiktigt genom att vända och/eller gunga ampullen.

Obs: Kontrollera att hela mängden RNase-fritt vatten injiceras i ampullen.

Olösliga material kan kvarbli efter att du har löst DNase I. På grund av produktionsprocessen kan olösligt material förekomma i lyofiliserat DNase I. Detta påverkar inte prestandan.

För långtidsförvaring av DNase I ska du ta bort lösningen från ampullen, fördela den i engångsalikvoter och förvara i -15 till -30 °C i upp till 9 månader. Tinade alikvoter kan förvaras i 2–8 °C i upp till 6 veckor. Frys inte ner upptinade alikvoter.

Förbereda RPE-buffert

Tillsät 4 delar (44 ml) etanol (96-100 %) i flaskan som innehåller 11 ml RPE-buffertkoncentrat. Markera kryssrutan på flasketiketten för att visa att etanol har tillsatts.

Obs: Innan du startar proceduren bör du blanda den rekonstituerade RPE-bufferten genom att skaka den.

Procedur

Viktigt att tänka på före start

- Om RNeasy DSP FFPE Kit används för första gången ska du läsa "Viktiga anmärkningar" (sidan 11)
- Om du arbetar med RNA för första gången bör du läsa "Bilagan: Allmänna hänvisningar angående RNA-hantering" (sidan 22).
- RBC-buffert innehåller ett guanidinsalt och är därför inte kompatibelt med desinficeringsreagenser som innehåller blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 8.
- Utför alla steg i proceduren i rumstemperatur om inte annat förskrivs (15-25 °C). Arbeta snabbt under proceduren och stanna inte mellan momenten.
- Utför alla centrifugeringssteg med en mikrocentrifug på 15-25 °C. Om du använder en kylld mikrocentrifug ska temperaturen vara 20-25 °C, annars kan den kylas under 15 °C.
- I nedanstående procedur indikerar ▲ vilka volymer som ska användas om du bearbetar 1-2 snitt per prov medan ● indikerar vilka volymer som ska användas om du bearbetar > 3-4 snitt per prov.
- Om du använder RPE-buffert och RNase-fritt DNase I för första gången ska du rekonstituera dem enligt beskrivningen i "Förberedelse av buffertar" (sidan 12)
- Ekvilibrera alla buffertar till rumstemperatur (15–25 °C). Blanda den rekonstituerade RPE-bufferten genom att skaka den.
- Ställ in ett värmeblandare på 56 °C för användning i steg 5 och steg 9. För att minska väntetiden ställer du en andra värmeblandare på 80 °C för steg 9.
- **Obs:** Avbryt inte reningsproceduren mellan momenten eftersom förlängd inkubationstid kan leda till förlorad eller sämre RNA. Den genomsnittliga bearbetningstiden för upp till 12 prover parallellt är cirka 130 minuter.

Protokoll: Rening av Total RNA från FFPE-vävnadsnitt

1. Trimma bort överflödigt paraffin från provblocket med en skalpell.
2. Skär 5-20 µm tjocka snitt.
Om provytan har exponerats för luft ska de första 2–3 snitten kasseras.
3. Placera snitten omedelbart i ett ▲ 1,5 ml eller ● 2 ml mikrocentrifugrör och stäng locket.
4. Tillsätt ▲ 160 µl eller ● 320 µl paraffinborttagande lösning. Vortexblanda ordentligt i 10 sekunder och centrifugera kort så att provet hamnar i botten av röret.
5. Inkubera i 56 °C i 3 minuter och låt provet sedan svalna i 5 minuter i rumstemperatur.
Om du använder för lite paraffinborttagande lösning eller om för mycket paraffin överförs med provet kan den paraffinborttagande lösningen bli vaxartad eller fast efter kylning. Om detta sker ska du lägga till mer paraffinborttagande lösning i steg om 160 µl och upprepa steg 5.
6. Tillsätt ● 150 µl eller ▲ 240 µl PKD-buffert och vortexblanda i 3 sekunder.
7. Centrifugera i 1 minut vid 11 000 x g.
8. Tillsätt 10 µl proteinas K till den lägre, genomskinliga fasen och blanda genom att försiktigt pipettera upp och ner 10 gånger (blanda inte separerade faser).
9. Inkubera i 56 °C i 15 minuter på 1 100 rpm, sedan i 80 °C i 15 minuter på 1 100 rpm.
Om endast ett värmeblock används ska provet stå i rumstemperatur efter inkuberingen vid 56 °C tills värmeblocket är uppe i 80°C.
Obs: Fullständig vävnadsnedbrytning av proteinas K krävs inte för maximal RNA-mängd, men inkubationssteget på 80 °C är mycket viktigt.
VIKTIGT: Kontrollera att värmeblocket har nått 80 °C innan du startar den 15 minuter långa inkubationen. Den 15 minuter långa inkubationen i 80 °C är viktig för att återställa formalinkorsbindning och optimal RNA-funktion i nedströmstillämpningar, till exempel Realtids-PT-PCR.
10. Centrifugera kort och överför ▲ 145 µl eller ● 230 µl av den lägre färglösa fasen i ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugrör.

11. Inkubera på is i 3 minuter. Centrifugera därefter i 15 minuter vid 20 000 x g.
12. Överför supernatanten till ett nytt 2 ml mikrocentrifugrör. Var noga med att inte rubba pelletten.
Pelletten innehåller olösligt vävnadsavfall, inklusive korsbunden DNA.
13. Tillsätt DNase Booster-buffert som motsvarar en tiondedel av den totala provvolymen (▲ 14.5 µl eller ● 23 µl) och 10 µl DNase I standardlösning. Blanda genom att vända röret. Centrifugera en kort stund för att samla upp eventuell vätska i botten av röret.
Obs: DNase I levereras lyofiliserad och bör rekonstitueras enligt beskrivningen i "Bereda DNase I standardlösning", sidan 12.
Obs: DNase I är mycket känslig för denaturering. Blanda DNase I (RNFD)-lösningen försiktigt genom att vända och/eller gunga röret. En vortex bör inte användas för att blanda.
14. Inkubera vid rumstemperatur i 15 minuter.
15. Tillsätt ▲ 320 µl eller ● 500 µl RBC-buffert för att justera bindningsförutsättningarna och vortexblanda lysatet noggrant i 3 sekunder och centrifugera kort.
16. Tillsätt ▲ 720 µl eller ● 1200 µl (100 %) i provet. Centrifugera inte. Gå sedan omedelbart vidare till steg 17.
Kondens kan vara synligt efter tillsats av etanol. Detta påverkar inte proceduren.
17. Blanda noggrant genom att pipettera 5 gånger upp och ner och överföra 700 µl prov, inklusive eventuell kondens, till en RNeasy MinElute-spinnkolonn i ett 2 ml uppsamlingsrör. Stäng locket försiktigt och centrifugera i 15 sekunder i $\geq 8\ 000 \times g$. Bortskaffa uppsamlingsröret med filtratet* och ställ kolonnen i ett nytt uppsamlingsrör (medföljer).
18. Upprepa steg 17 (utan extra blandning) tills hela provet har passerat genom RNeasy MinElute-spinnkolonnen.
19. Tillsätt 500 µl RPE-buffert i RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Stäng locket försiktigt och centrifugera i 15 sekunder i $\geq 8\ 000 \times g$. Bortskaffa uppsamlingsröret med filtratet* och ställ kolonnen i ett nytt uppsamlingsrör (medföljer).
Obs: RPE-bufferten levereras som ett koncentrat. Kontrollera att etanol tillsätts före användning enligt beskrivningen i "Förebreda RPE-buffert".

* Filtratet innehåller RBC-buffert och är därför inte kompatibel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 8.

20. Tillsätt 500 µl RPE-buffert i RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Stäng locket försiktigt och centrifugera i 2 minuter i $\geq 8\ 000 \times g$ för att tvätta membranet på spinnkolonnen. Bortskaffa uppsamlingsröret med filtratet* och ställ kolonnen i ett nytt uppsamlingsrör (medföljer).

Obs: Ta försiktigt bort RNeasy MinElute-spinnkolonnen från uppsamlingsröret efter centrifugeringen så att kolonnen inte kommer i kontakt med filtratet. Om detta sker kommer etanol att överföras.

21. Öppna locket till spinnkolonnen och centrifugera i full hastighet i 5 minuter. Bortskaffa uppsamlingsröret med filtratet.

För att undvika att locken skadas placerar du spinnkolonnerna i centrifugen med minst en tom position mellan kolonnerna. Rikta locken så att de pekar i motsatt riktning mot rotorns rotation (om t.ex. rotorn roterar medurs riktar du locken moturs).

Det är viktigt att du torkar av membranet på spinnkolonnen eftersom rester av etanol kan interferera med nedströms-reaktionerna. Centrifugering med öppna lock säkerställer att ingen etanol överförs under RNA-eluering.

22. Placera RNeasy MinElute-spinnkolonnen i ett nytt 1,5 ml uppsamlingsrör (medföljer). Tillsätt 14-32 µl RNase-fritt vatten direkt i mitten av spinnkolonnens membran. Stäng locket försiktigt och centrifugera i full hastighet i 1 minut för att eluera RNA:t.

Eluering med mindre volymer RNase-fritt vatten leder till högre total-RNA-koncentrationer, men mindre RNA-mängd.

Obs: För förväntade låga RNA-mängder rekommenderas ett rör med låg bindning för eluering (medföljer ej). Det innebär att dödvolymen hos RNeasy MinElute-spinnkolonnen är 2 µl: eluering med 14 µl RNase-fritt vatten ger cirka 12 µl eluat.

23. Förvara RNA-eluat i -60 till -90 °C eller i -15 till -30 °C i upp till 8 veckor.

* Filtratet innehåller RBC-buffert och är därför inte kompatibel med blekmedel. Säkerhetsinformation finns på sidan 8.

Kvalitetskontroll

För att säkerställa en enhetlig produktkvalitet testas varje lotnummer av theascreen RNeasy DSP FFPE med fastställda specifikationer enligt QIAGENs ISO-certifierade kvalitetshanteringsystem.

Begränsningar

Systemprestandan har fastställts i prestandautvärderingar där human-RNA har renats från formalinfixerade, paraffinbäddade prover.

Det är användarens ansvar att validera systemets prestanda för procedurer som används i deras laboratorium och som inte ingår i QIAGEN:s prestandastudier.

För att minimera risken för negativ påverkan på diagnostiska resultat bör lämpliga kontroller för nedströmsapplikationer användas.

Eventuella diagnostiska resultat som erhålls måste tolkas tillsammans med övriga kliniska fynd eller laboratoriefynd.

Symboler

Symbolerna i följande tabell används i denna bruksanvisning.



<N>

Innehåller tillräckligt med reagenser för <N> reaktioner



Används senast



In vitro-diagnostisk medicinsk produkt



Vid ankomst



DN



RNeasy MinElute Spin



Katalognummer



Lotnummer



Materialnummer (dvs. komponentetikett)



Komponenter (dvs. en lista över vad som ingår)

CONT

Innehåller (innehåll)

NUM

Antal (dvs. vialer, flaskor)

GTIN

Globalt handelsartikelnummer (Global Trade Item Number)

Rn

R är revisionen av bruksanvisningen (handboken), n är revisionsnumret



Temperaturbegränsning



Tillverkare



Se bruksanvisningen



Försiktighet

PROTK

Proteinas K

Sodium azide

Natriumazid

Felsökningshandbok

Den här felsökningsguiden kan vara till hjälp för att lösa eventuella problem som kan uppstå. Mer information finns på sidan Frequently Asked Questions (Vanliga frågor) på vårt tekniska supportcenter: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Dessutom svarar teamet för QIAGEN:s tekniska service gärna på frågor om informationen och/eller protokollen i denna handbok eller prov- och analysmetoder (för kontaktinformation, besök www.qiagen.com).

Kommentarer och förslag på åtgärd

RNeasy MinElute-spinnkolonnen är blockerad

- | | | |
|----|---|--|
| a) | För mycket startmaterial | Minska mängden startmaterial. Det är viktigt att använda rätt mängd startmaterial (se sidan 11). |
| b) | Centrifugerings Temperaturen är för låg | Centrifugerings Temperaturen bör vara 15–25°C. Vissa centrifuger svalnar till under 15°C även när de är inställda på 20°C. Detta kan leda till kondensbildning, vilket kan blockera RNeasy MinElute-spinnkolonnen. Om detta sker bör du ställa in centrifugen på 25°C. |

Lågt RNA-utbyte

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Startmaterialet är av dålig kvalitet | Prover som har varit fixerade i över 24 timmar eller som har förvarats länge innehåller endast små mängder användbart RNA. Snitt som har monterats på mikroskopglas ger mycket små mängder användbart RNA på grund av luftexponering. |
| b) | För mycket startmaterial | Om RNeasy MinElute-spinnkolonnen överbelastas minskar utbytet av nukleinsyra avsevärt. Minska mängden startmaterial (se sidan 11). |
| c) | RNA är fortfarande bundet till RNeasy MinElute-spinnkolonnmembran | Upprepa RNA-eluering men inkubera RNeasy MinElute-spinnkolonnen på arbetsbänken i 10 minuter med RNF7 före centrifugering. |
| d) | Fel förvaring av buffertar/reagenser | RNeasy MinElute-spinnkolonner och DNase I måste förvaras i 2-8°C direkt när kitet tas emot. Kontrollera förvaringstemperaturen, eftersom högre temperaturer under längre tid kan försämra funktionen. |

Lågt A_{260}/A_{280} -värde

- | | | |
|----|--|---|
| a) | Vatten användes för att späda nukleinsyra för mätning av A_{260}/A_{280} | Använd 10 mM Tris Cl, pH 7,5 istället för vatten för att späda provet innan du mäter dess renhet. |
|----|--|---|

Kommentarer och förslag på åtgärd

DNA-kontaminering i nedströmstillämpningar

- a) För mycket startmaterial För vissa typer av vävnad kan effektiviteten hos DNA-borttagningen minska när stora mängder bearbetas. Om eluerat RNA innehåller stora mängder DNA-kontamination kan du försöka att bearbeta färre vävnadssnitt per förberedelse
- b) Vävnaden har högt DNA-innehåll När du bearbetar stora mängder DNA-rik vävnad (till exempel thymus) bryts DNA inte ner helt. Upprepa reningsproceduren med färre vävnadssnitt. Kontrollera att DNase I har förvarats korrekt enligt beskrivningen i "Reagensförvaring och -hantering" samt "Förbereda DNase I standardlösning".
- c) Omvänd transkribering med otillräcklig mängd RNA Många omvända transkriptaser är avsedda för användning med cirka 1 µg RNA. Om du utför omvänd transkription med mycket små mängder RNA rekommenderar vi att du använder ett omvänt transkriptas som är särskilt utformat för högkänsliga omvända transkriptioner.

RNA fungerar inte bra i nedströmsanalyser/-tillämpningar

- a) RNA är fragmenterat eller på grund av formalinmodifiering Inkubationen i 80°C i RNeasy DSP FFPE-proceduren är viktig för optimal RNA-funktion vid omvänd transkribering eller andra enzymatiska nedströmstillämpningar. Kontrollera att inkubationstemperaturen håller 80°C genom hela den 15-minuter långa inkubationen. Även om inkubationen i 80°C avlägsnar vissa formalinmodifikationer är RNA som har renats från FFPE-snitt inte en optimal mall för enzymatiska reaktioner. Vi rekommenderar att endast slumpmässiga eller genspecifika primers används för cDNA-syntes. Vi rekommenderar även att du håller amplikoner så korta som möjligt för PCR (<500 nukleotider).
- b) Etanol-carry-over Var noga med att centrifugera på $\geq 8,000 \times g$ i 2 minuter i 15–25°C vid den andra tvätten med RPE-buffert för att torka RNeasy MinElute-spinnkolonnmembranet. Ta försiktigt bort kolonnen från uppsamlingsröret efter centrifugeringen så att kolonnen inte kommer i kontakt med filtratet. Placera sedan kolonnen i ett nytt uppsamlingsrör och centrifugera på full hastighet i 5 minuter.
- c) Salt-carry-over vid RNA-eluering Kontrollera att RPE-bufferten rekonstituerades genom att lägga till rätt volym etanol och att bufferten har rumstemperatur (15–25°C)
- d) Omvänd transkribering med otillräcklig mängd RNA Många omvända transkriptaser är avsedda för användning med cirka 1 µg RNA. Om du utför omvänd transkription med mycket små mängder RNA rekommenderar vi att du använder ett omvänt transkriptas som är särskilt utformat för högkänsliga omvända transkriptioner.

Bilaga: Allmänna hänvisningar angående RN A-hantering

Arbete med RNA

Ribonukleaser (RNase) är mycket motståndskraftiga och aktiva enzymer, som normalt inte behöver kofaktorer för att vara aktiva. RNaser är svåra att inaktivera och endast en liten mängd räcker för att bryta ner RNA. Därför skall inga laboratoriematerial av glas eller plast användas, där RNase-kontaminationer inte eliminerats först. Se till att inga RNase-kontaminationer kan tillkomma på RNA-proven under eller efter nukleinsyraproceduren. För att skapa och bevara en RNase-fri omgivning bör de påföljande försiktighetsåtgärderna följas vid förbehandling och bruk av engångs- och flegångsbehållare och lösningar när du arbetar med RNA.

Allmän hantering

Arbetet med RNA skall alltid följa principerna för ordentliga mikrobiologiska och aseptiska arbetstekniker. Händer och dammpartiklar kan bära på bakterier och mögelsvampar, vilket är de vanligaste orsakerna till RNase-kontamination. Bär därför alltid latex- eller vinylhandskar vid hantering av reagenser eller RNA-prov för att undvika en RNase-kontamination via huden eller genom dammiga laboratorieinstrument. Byt laboratoriehandskarna ofta och stäng alltid alla behållare direkt efter användning. Låt renad RNA ligga kvar på is, om olika pipetteras för vidare applikationer.

För att avlägsna RNase-kontamination från bänkytor, flegångsbehållare och laboratorieutrustning (till exempel pipetter och elektroforesbehållare) bör du använda RNaseZap® (kat. nr AM9780) från Ambion®. RNase-kontamination kan även avlägsnas med vanliga laboratoriereagenser. För att avkontaminera plastföremål, skölj med 0,1 NaOH, 1 mM EDTA följt av RNase-fritt vatten (se "Lösningar", sidan 23) eller skölj med kloroform om platen är kloroformtålig. För att avkontaminera elektroforesbehållare ska du rengöra

med rengöringsmedel (till exempel 0,5 % SDS), skölja med RNase-fritt vatten, skölja med etanol (om behållarna är etanoltåliga) och låta torka.

Engångsplastartiklar

Vi rekommenderar att du använder engångsrör av polypropylen för proceduren. Dessa provrör är vanligtvis RNase-fria och behöver ingen förbehandling för att inaktivera RNaser.

Glasartiklar

Glasartiklar ska behandlas före användningen för att säkerställa att de är fria från RNase. Glasartiklar som ska användas för RNA-arbete ska rengöras med rengöringsmedel, sköljas noga och ugnsbakas i 240 °C i minst 4 timmar (över natten, om det är mer bekvämt) före användningen. Enbart autoklivering kommer inte helt att inaktivera många RNaser. Alternativt kan glaset behandlas med DEPC* (dietylpyrokarbonat), vilket beskrivs nedan i "Lösningar".

Lösningar

Lösningar (vatten och andra lösningar) ska behandlas med 0,1 % DEPC. DEPC är en stark, men inte en absolut, hämmare av RNaser. Det används ofta vid en koncentration av 0,1 % för att inaktivera RNaser på glas eller plast, eller för att bilda RNase-fria lösningar och vatten. DEPC inaktiverar RNaser genom kovalent modifiering. Tillsätt 0,1 ml DEPC till 100 ml av den lösning som ska behandlas och skaka kraftigt för att blanda DEPC i lösningen. Låt lösningen inkubera i >12 timmar vid 37 °C ± 3 °C. Autoklavera i 15 minuter för att ta bort alla spår av DEPC. DEPC reagerar med primäraminerna och kan inte användas direkt för att behandla Tris-buffertar. DEPC är mycket instabilt i närvaro av Tris-buffert och bryts snabbt ned till etanol och CO₂. Vid preparering av Tris-buffertar ska vattnet först behandlas med DEPC, och därefter ska Tris lösas upp för att bilda lämplig buffert. Spårbara mängder DEPC modifiera purina rester i RNA genom karboxylering. Karboxylerat RNA förflyttas med mycket låg effektivitet i cellfria system. Dess förmåga att bilda DNA:RNA- eller RNA:RNA-hybrider påverkas emellertid inte allvarligt, såvida inte en stor fraktion av purina rester har modifierats. Rester av DEPC måste alltid avlägsnas från lösningar och kärl genom autoklivering eller uppvärmning till 100 °C i 15 minuter

Obs: RNeasy-buffertar är garanterat RNase-fria utan DEPC-behandling och är därmed också fria från DEPC-kontaminering.

Beställningsinformation

Produkt	Innehåll	Kat.nr
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute-spinnkolonner, elueringsrör, tvättrör, lyseringsrör, RNase-fria reagenser och buffertar.	73604

Aktuell licensinformation och produktspecifika ansvarsfriskrivningar finns i handboken eller användarmanualen till respektive QIAGEN-kit. Handböcker och användarmanualer till QIAGEN-kiten finns på www.qiagen.com eller kan beställas från QIAGENS tekniska support eller din lokala distributör.

Obs

Obs

Begränsat licensavtal för RNeasy DSP FFPE Kit

Användning av den här produkten innebär att köpare eller användare av produkten godkänner följande villkor:

1. Produkten får endast användas i enlighet med de protokoll som medföljer produkten och den här handboken och får endast användas med komponenterna som ingår i kitet. QIAGEN ger ingen licens för någon av sina immateriella tillgångar för att använda eller inkludera komponenterna i detta kit med komponenter som inte ingår i detta kit förutom vad som beskrivs i de protokoll som medföljer produkten, den här handboken och ytterligare protokoll som finns på www.qiagen.com. Vissa av de här ytterligare protokollen har tillhandahållits av QIAGEN-användare för andra QIAGEN-användare. De här protokollen har inte testats noggrant eller optimerats av QIAGEN. QIAGEN garanterar inte att de inte kränker tredje parts rättigheter.
2. Förutom de uttryckligen angivna licenserna kan QIAGEN inte garantera att detta kit och/eller dess användning inte kränker oberoende tredje parts rättigheter.
3. Kitet och dess komponenter är licensierade för engångsbruk och får inte återanvändas, förbättras eller säljas vidare.
4. QIAGEN fransäger sig specifikt alla andra licenser, uttryckliga eller underförstådda, bortsett från dem som uttryckligen angivits.
5. Inköparen och användaren av detta kit samtycker till att inte vidta eller tillåta att någon annan vidtar några steg som kan leda till eller underlätta några åtgärder som är förbjudna enligt ovan. QIAGEN kan kräva upphävande av detta begränsade licensavtal i domstol och ska ersättas för alla undersöknings- och rättegångskostnader, inklusive advokatkostnader, vid eventuell åtgärd för att upprätthålla detta begränsade licensavtal eller någon av företagets immateriella rättigheter avseende kitet och/eller någon av dess komponenter.

För uppdaterade licensvillkor, se www.qiagen.com.

Varumärken: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific eller dess dotterbolag).
Registrerade namn, varumärken etc. som används i det här dokumentet ska inte anses som oskyddade enligt lag även om de inte uttryckligen anges som skyddade.
08/2017 HB-2416-001 1106945 © 2012–2017 QIAGEN, med ensamrätt.

Beställning www.qiagen.com/shop | Teknisk support support.qiagen.com | Webbplats www.qiagen.com