

Prosinec 2017

List protokolu QIASymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP a Tissue_HC_200_V7_DSP

Tento dokument Tissue_LC_200_V7_DSP a Tissue_HC_200_V7_DSP je *listem protokolu přístroje QIASymphony SP, R3*, pro sadu QIASymphony DSP DNA Mini, verze 1.

Všeobecné informace

Sada QIASymphony DSP DNA je určena pro diagnostické účely in vitro.

Tyto protokoly jsou určeny k purifikaci celkové DNA z tkání a z tkání fixovaných formaldehydem a zatavených v parafínu (FFPE) pomocí sady QIASymphony® SP a sady QIASymphony DSP DNA Mini.

V závislosti na typu vzorku doporučujeme používat buď protokol pro nízký obsah (LC), nebo vysoký obsah (HC). Tkáň budou dávat zvýšené výtěžky DNA, pokud budou zpracovávány protokolem vysokého obsahu, ale protokol nízkého obsahu v kombinaci s malým elučním objemem (50 µl) lze použít, pokud se vyžaduje vysoká koncentrace DNA. Pro tkáň FFPE doporučujeme použít protokol nízkého obsahu.

Protokol nízkého obsahu

Sada	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (katalogové číslo 937236)
Materiál vzorku	Tkáň FFPE a tkáň* Do jednoho přípravku lze kombinovat až 4 tkáňové řezy FFPE, každý o tloušťce až 10 µm, nebo 8 řezů o tloušťce až 5 µm a povrchové ploše až 250 mm ² .
Název protokolu	Tissue_LC_200_V7_DSP
Výchozí množina analytických kontrol	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Eluční objem	50 µl, 100 µl, 200 µl nebo 400 µl
Vyžadovaná verze softwaru	Verze 4.0 nebo vyšší

* Viz protokol vysokého obsahu, kde naleznete informace o tkáňových vzorcích

Protokol vysokého obsahu

Sada	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (katalogové číslo 937236)
Materiál vzorku	Tkáň Pokud nebude k dispozici žádná informace o očekávaném výtěžku, doporučujeme začít s 25 mg vzorku materiálu. V závislosti na získaném výtěžku lze zvětšit velikost vzorku u následných preparátů.
Název protokolu	Tissue_HC_200_V7_DSP
Výchozí množina analytických kontrol	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Eluční objem	100 µl, 200 µl, nebo 400 µl
Vyžadovaná verze softwaru	Verze 4.0 nebo vyšší

Požadované materiály, které nejsou součástí dodávky

Pro všechny typy vzorků

- Pufr ATL, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, katalogové číslo 939016)
- Pro minimalizaci obsahu RNA: RNáza A zbavená DNázy (zásobní roztok 100 mg/ml)

Pro tkáň FFPE (deparafinizace bez použití xylenu)

- Deparafinizační roztok (Deparaffinization Solution, katalogové číslo 939018)

Pro tkáň FFPE (deparafinizace pomocí xylenu)

- Xylen (99–100 %)
- Ethanol (96–100 %)*

“Sample” drawer

Typ vzorku	Tkáň FFPE a tkáň
Vstupní objem vzorku	220 µl (vyžaduje se na vzorek, na protokol) [†]
Objem zpracovaného vzorku	200 µl
Zkumavky primárního vzorku	Neuvedeno
Zkumavky sekundárního vzorku	Další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Vložky	Závisí na typu použitých zkumavek na vzorky; více informací získáte na www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] Jak u protokolu pro nízký, tak pro vysoký obsah platí, že systém nerozpozná, zda je objem vzorku menší než 220 µl, protože přenos vzorků se provádí bez detekce hladiny kapaliny. Proto musíte zajistit, že vstupní objem vzorku je 220 µl.
n/a = neuvedeno.

Zásuvka "Reagents and Consumables" (Reagencie a spotřební díly)

Poloha A1 a/nebo A2	Kazeta reagencí
Poloha B1	Neuvedeno
Držák se stojánkem pro špičky 1–17	Filtrační špičky k jednorázovému použití 200 µl nebo 1500 µl
Držák jednotkové krabice 1–4	Jednotkové krabice obsahující vzorové preparáty nebo 8tyčové kryty

n/a = neuvedeno.

* Nepoužívejte denaturovaný alkohol, který obsahuje další látky, jako je methanol nebo methylethylketon.

Zásuvka "Waste" (Odpad)

Držák jednotkové krabice 1–4	Prázdné jednotkové krabice
Držák odpadních sáčků	Odpadní sáček
Držák lahve na kapalný odpad	Prázdna lahev na kapalný odpad

Zásuvka "Eluate" (Eluát)

Eluční stojánek (doporučujeme použít chladicí pozici, slot 1)	Další informace viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
--	--

Požadované plastové vybavení

plastové vybavení	Jedna šarže, 24 vzorků*	Dvě šarže, 48 vzorků*	Tři šarže, 72 vzorků*	Čtyři šarže, 96 vzorků*
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 200 µl ^{†‡}	26	50	74	98
Filtrační špičky k jednorázovému použití, 1500 µl ^{†‡}	72	136	200	264
Kazety vzorkových preparátů [§]	21	42	63	84
8tyčové kryty [¶]	3	6	9	12

* Použití méně než 24 vzorků na šarži snižuje počet filtračních špiček k jednorázovému použití požadovaných na jeden běh.

[†] Je tu 32 filtračních špiček/stojánek na filtrační špičky.

[‡] Počet požadovaných filtračních špiček zahrnuje filtrační špičky pro 1 snímek inventáře na kazetu s reagenciemi.

[§] Je tu 28 kazet s preparáty vzorku/jednotková krabice.

[¶] Je tu dvanáct 8tyčových krytů/jednotková krabice.

Note: Numbers of filter-tips given may differ from the numbers displayed in the touchscreen depending on settings. We recommend loading the maximum possible number of tips.

Eluční objem

Eluční objem se vybírá na dotykové obrazovce. V závislosti na typu vzorku a obsahu DNA se může konečný eluční objem změnit až o 15 µl směrem dolů vůči zvolenému objemu. Díky tomu, že se eluční objem může měnit, doporučujeme zkontrolovat aktuální objem eluátu při používání systému automatického nastavení kvantitativní analýzy, který před přenosem neověřuje eluční objem. Eluce při nižších objemech zvyšuje konečnou koncentraci DNA, ale mírně snižuje výtěžek. Doporučujeme používat eluční objem vhodný pro zamýšlenou aplikaci v dalších krocích.

Příprava materiálu vzorku

Při práci s chemikáliemi vždy používejte vhodný laboratorní plášť, rukavice na jedno použití a ochranné brýle. Další informace jsou uvedeny v příslušných bezpečnostních listech (BL), které lze získat od dodavatele produktu.

Důležitý bod před zahájením

- Magnetické částice QIASymphony společně purifikují RNA a DNA, pokud jsou ve vzorku přítomny obě kyseliny. Chcete-li ve vzorku minimalizovat obsah RNA, přidejte RNázu A do vzorku v kroku uvedeném v příslušném protokolu předběžné úpravy.

Věci, které je nutné udělat před zahájením

- Zkontrolujte pufr ATL, zda neobsahuje bílý precipitát. Bude-li to nezbytné, inkubujte 30 minut při 37°C za občasněmu protřepávání, aby se precipitát rozpustil.
- Nastavte termomixér nebo třepačku-inkubátor na teplotu vyžadovanou pro příslušné předběžnou úpravu.*

Tkáně

Čerstvou a zmraženou tkáň lze použít k purifikaci DNA. Výtěžek a kvalita DNA budou záležet na typu tkáně, zdroji a podmínkách uchovávání. Čerstvou tkáň lze před zpracování rozřezat na malé kousky a uložit při -20°C nebo -80°C . Všeobecně doporučujeme použít protokol vysokého obsahu, který dává zvýšené výtěžky DNA. Protokol nízkého obsahu v kombinaci s elučním objemem 50 μl se doporučuje pouze v případě, že jsou v analýze při dalších krocích požadovány vysoké koncentrace DNA. Pokud nebudou k dispozici žádné informace o očekávaném výtěžku, doporučujeme začít s 25 mg materiálu vzorku s využitím protokolu vysokého obsahu a eluční objem 200 μl . V závislosti na získaném výtěžku lze u následných preparátů zvětšit velikost vzorku nebo zmenšit eluční objem. Nezapomeňte, že preparáty způsobující přetížení v kombinaci s malými elučními objemy mohou způsobit přenos magnetický částic do eluátu a mohly by narušit čistotu DNA a analýzu v dalších krocích.

* Ujistěte se, že jsou přístroje kontrolovány, udržovány a pravidelně kalibrovány podle doporučení výrobce.

Protokol předběžné úpravy pro tkáň

1. Přeneste vzorek tkáně do 2 ml zkumavky pro mikrocentrifugu (nedodává se).
2. Přidejte 220 µl pufru ATL.
3. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte poklepáním na zkumavku.

Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy sady QIA Symphony DSP DNA Mini.

4. Vložte zkumavku do termomixéru nebo inkubátoru–třepačky a inkubujte při 56 °C s protřepáváním při 900 ot/min, dokud nedojde k úplné lýze tkáně.

Poznámka: Doba lýzy se mění v závislosti na typu zpracovávané tkáně. U většiny tkání je lýza dokončena v průběhu 3 hodin. Pokud nebude lýza dokončena po 3 hodinách, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu nebo vysoce viskózních lyzátů, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál odstranit odstředováním, jak to popisuje krok 6. Lýza prováděná přes noc je možná a neovlivňuje nepříznivě přípravek.

5. Chcete-li minimalizovat ve vzorku obsah RNA, přidejte 4 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě (15–25 °C), než budete pokračovat krokem 6.
6. Vzorek homogenizujte několikanásobným pipetováním nahoru a dolů.

Poznámka: Pokud budou stále přítomny kusy nerozpustného materiálu, odstředujte při 3000 x g po 1 minutu.

7. Pečlivě převedte 220 µl supernatantu do zkumavek vzorku, které jsou kompatibilní s nosičem vzorku QIA Symphony SP.

Úplný seznam kompatibilních zkumavek vzorku viz

www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Doporučujeme používat 2 ml zkumavky (např. Sarstedt, katalogové číslo 72.693 nebo 72.608).

Tkáň FFPE

Standardní postupy fixace formaldehydem a zatařování do parafínu vždy vedou k významné fragmentaci nukleových kyselin. Pro omezení rozsahu fragmentace DNA zajistěte:

- Fixujte vzorky tkání v 4–10% formaldehydu co nejrychleji po chirurgickém vyjmutí.
- Používejte fixační dobu 14–24 hodin (delší fixační časy vedou k závažnější fragmentaci DNA, což má za následek špatné výsledky analýz prováděných v dalších krocích).
- Před zatařením vzorky důkladně dehydrujte (zbytkový formaldehyd může inhibovat digeraci proteinázy K)

Výchozí materiál pro purifikaci DNA by měly tvořit čerstvě připravené řezy tkáně FFPE. V jednom přípravku lze zpracovat až 4 tkáňové řezy, každý o tloušťce až 10 µm, nebo 8 řezů o

tloušťce až 5 µm a povrchové ploše až 250 mm². Pokud nebudete mít žádné informace o povaze svého výchozího materiálu, doporučuje začít s nejvýše 3 řezy v jediném přípravku. V závislosti na výtěžku DNA a jeho čistotě lze možná použít až 8 řezů v následných přípravcích.

Poznámka: Protokoly pro tkáň FFPE jsou speciálně navrženy pouze pro společnou purifikaci nízkých množství RNA. Výsledkem bude snížená hodnota fotometrických měření v porovnání s hodnotami získanými pomocí ruční sady QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Předběžná úprava pro tkáň FFPE

Metoda 1: deparafinizace pomocí deparafinizačního roztoku

1. Skalpelem odstraňte přebytečný parafín z bloku vzorku.
2. Nařežte až 4 řezy o tloušťce 10 µm nebo až 8 řezů o tloušťce 5 µm
Poznámka: Pokud byl povrch vzorku vystaven působení vzduchu, první 2–3 řezy zlikvidujte.
3. Ihned vložte řezy do 2 ml zkumavky Sarstedt (nedodává se s přístrojem, katalogové číslo 72.693 nebo 72.608), která je kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.
4. K řezům přidejte 200 µl pufru ATL.
5. Přidejte 20 µl proteinázy K.
Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy sady QIASymphony DSP DNA Mini.
6. Přidejte 160 µl nebo 320 µl deparafinizačního roztoku (viz následující tabulka) a promíchejte ve vortexu.

Thickness of sections	Number of sections	Volume of Deparaffinization solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Vložte zkumavku do termomixéru nebo inkubátoru–třepačky a inkubujte při 56°C na 1 hodinu s protřepáváním při 1000 ot/min (dokud nedojde k úplné lýze tkáně).
Poznámka: Doba lýzy se mění v závislosti na typu zpracovávané tkáně. U většiny tkání je lýza dokončena v průběhu 1 hodiny. Pokud nebude lýza dokončena po 1 hodině, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál granulovat odstředováním, jak to popisuje krok 10. Lýza prováděná přes noc je možná a neovlivňuje nepříznivě přípravek.

8. Inkubujte při 90°C 1 hodinu.
Poznámka: Inkubace při 90°C v pufru ATL částečně revertuje formaldehydovou modifikaci nukleových kyselin. Delší inkubační doby nebo vyšší inkubační teploty mohou vést k fragmentovanější DNA. Pokud použijete pouze jeden topný blok, nechte vzorek při pokojové teplotě po inkubaci při 56°C, dokud topný blok nedosáhne 90°C.
9. Chcete-li minimalizovat ve vzorku obsah RNA, přidejte 2 µl RNázy A (100 mg/ml) do dolní fáze a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě, než budete pokračovat krokem 10. Nechte vzorek zchladnout na pokojovou teplotu před přidáním RNázy A.
10. Centrifugujte plnou rychlostí 1 minutu při pokojové teplotě.
11. Pečlivě přeneste zkumavky (obsahující obě fáze) do nosiče vzorku QIASymphony SP.

Metoda 2: deparafinizace pomocí xylenu

1. Skalpelem odstraňte přebytečný parafín z bloku vzorku.
2. Nařezejte až 4 řezy o tloušťce 10 µm nebo až 8 řezů o tloušťce 5 µm.
Poznámka: Pokud byl povrch vzorku vystaven působení vzduchu, první 2–3 řezy zlikvidujte.
3. Ihned vložte řezy do 1,5 ml nebo 2 ml zkumavky mikrocentrifugy (nedodává se) a přidejte k vzorku 1 ml xylenu. Uzavřete víčko a míchejte intenzivně ve vortexu 10 sekund.
4. Centrifugujte plnou rychlostí 2 minutu při pokojové teplotě.
5. Supernatant odstraňte pipetováním. Neodebírejte žádnou hrudku.
6. K hrudce přidejte 1 ml etanolu (96–100%) a míchejte ve vortexu.
Poznámka: Etanol ze vzorku extrahuje zbytkový xylen.
7. Centrifugujte plnou rychlostí 2 minutu při pokojové teplotě.
8. Supernatant odstraňte pipetováním. Neodebírejte žádnou hrudku.
Poznámka: Opatrně odeberte jakýkoliv zbytkový etanol špičkou jemné pipety.
9. Otevřete zkumavku a inkubujte při pokojové teplotě (15–25°C) 10 minut nebo dokud se veškerý zbytkový etanol neodpaří.
Poznámka: Inkubaci lze provést při teplotách až do 37°C.
10. Hrudku znovu suspendujte ve 220 µl pufru ATL.
11. Přidejte 20 µl proteinázy K a promíchejte ve vortexu.
Poznámka: Použijte proteinázu K ze stojánku na enzymy sady QIASymphony DSP DNA Mini.

12. Inkubujte 1 hodinu při 56°C (nebo dokud nedojde k úplné lýze vzorku).
- Poznámka:** Doba lýzy se mění v závislosti na typu zpracovávané tkáně. U většiny tkání je lýza dokončena v průběhu 1 hodiny. Pokud nebude lýza dokončena po 1 hodině, o čemž bude svědčit přítomnost nerozpustného materiálu, dobu lýzy lze prodloužit, případně nerozpustný materiál odstranit odstředováním, jak to popisuje krok 16. Lýza prováděná přes noc je možná a neovlivňuje nepříznivě přípravek.
13. Inkubujte při 90°C 1 hodinu.
- Poznámka:** Inkubace při 90°C v pufru ATL částečně revertuje formaldehydovou modifikaci nukleových kyselin. Delší inkubační doby nebo vyšší inkubační teploty mohou vést k fragmentovanější DNA. Pokud použijete pouze jeden topný blok, nechte vzorek při pokojové teplotě po inkubaci při 56°C, dokud topný blok nedosáhne 90°C.
14. Krátce odstředujte vzorek pro odstranění kapek z vnitřní strany víka.
15. Chcete-li minimalizovat ve vzorku obsah RNA, přidejte 2 µl RNázy A (100 mg/ml) a inkubujte 2 minuty při pokojové teplotě, než budete pokračovat krokem 16. Nechte vzorek zchladnout na pokojovou teplotu před přidáním RNázy A.
16. Pečlivě převedte 220 µl lyzátu do zkumavek vzorku, které jsou kompatibilní s nosičem vzorku QIASymphony SP.
- Poznámka:** Pokud lyzát obsahuje nedigerovaný materiál, odstředujte při plné rychlosti 2 minuty při pokojové teplotě před přenosem supernatantu do zkumavek vzorku. Úplný seznam kompatibilních zkumavek vzorku viz www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Doporučujeme používat 2 ml zkumavky (např. Sarstedt, katalogové číslo 72.693 nebo 72.608).

Historie revizí

Historie revizí dokumentu	
R3 12/2017	Aktualizace pro software QIASymphony verze 5.0

Aktuální licenční informace a odmítnutí odpovědnosti specifická pro výrobek jsou uvedeny v příslušné příručce pro sadu QIAGEN® nebo příručce uživatele. Příručky pro sady QIAGEN a příručky uživatele jsou dostupné na www.qiagen.com nebo na požádání u technického servisu QIAGEN nebo místního distributora.

Ochranné známky: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Registrované názvy, ochranné známky atd. použité v tomto dokumentu, a to i v případě, že takto nejsou výslovně označeny, nejsou považovány za zákonem nechráněné.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, všechna práva vyhrazena.

Objednávky www.qiagen.com/shop | Technická podpora support.qiagen.com | Webová stránka www.qiagen.com