

Caratteristiche prestazionali

Kit RNeasy® DSP FFPE, Versione 1

REF 73604

Gestione della versione

Il presente è il documento Caratteristiche prestazionali del kit RNeasy DSP FFPE, Versione 1, R1.

  	<p>Prima di eseguire i test, verificare l'eventuale disponibilità di nuove revisioni delle etichette elettroniche sulla pagina web www.qiagen.com/HB-2416. Lo stato della revisione è indicato dalla data di rilascio (formato: mese/anno).</p>
---	---

Introduzione generale

Il kit RNeasy DSP FFPE è studiato per la purificazione dell'RNA totale da tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE).

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare. Utilizza un protocollo ottimizzato basato su colonnina spin in silice e include la rimozione enzimatica del DNA residuo.

Il kit RNeasy DSP FFPE isola le molecole di RNA più lunghe di 70 nucleotidi e fornisce il recupero di frammenti di RNA utilizzabili per applicazioni a valle come RT-PCR.

Resa dell'RNA purificato

Le prestazioni di base del kit RNeasy DSP FFPE sono state valutate utilizzando campioni FFPE da 5 diversi tessuti umani (tumore della mammella, del colon, del polmone, melanoma e pelle normale con 20 campioni ciascuno).

I campioni FFPE possono presentare un alto grado di eterogeneità dei tessuti. Inoltre nei campioni FFPE l'area superficiale dei tessuti è molto variabile, il che comporta una variabilità della quantità di RNA estratto. Pertanto, l'utente deve ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per il proprio campione di interesse e per ogni procedura utilizzata nel proprio laboratorio.

Se il kit viene utilizzato unitamente a un'applicazione a valle QIAGEN®, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni.

Un'insufficiente disidratazione dei tessuti durante la preparazione dei tessuti FFPE, con l'aggiunta di una quantità eccessiva di paraffina al campione nella provetta di estrazione, l'utilizzo di etanolo con un grado di purezza inferiore rispetto a quello raccomandato (cioè non con grado di purezza per la biologia molecolare) o il persistere nel campione di residui di etanolo può comportare un'estrazione inferiore a quella ottimale e una bassa quantità di RNA o prestazioni a valle ridotte.

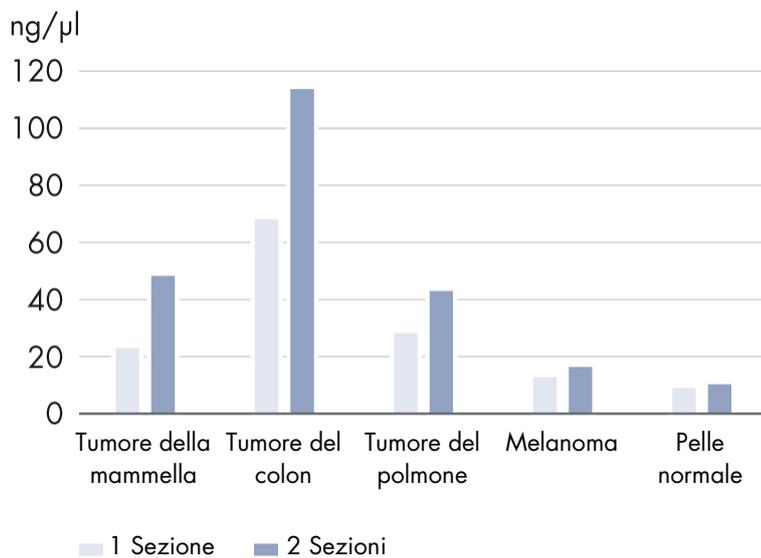


Figura 1. Rese di RNA da tessuti umani diversi (volume di eluizione di 32 µl).

Analisi a valle

L'RNA eluito può essere utilizzato in analisi a valle. Per valutare le prestazioni, con il kit RNeasy DSP FFPE sono stati isolati 10 ng di RNA da 5 tessuti umani differenti (tumore della mammella, del colon, del polmone, melanoma e pelle normale; 20 campioni composti da una o due sezioni), validati utilizzando RT-PCR avente come target il gene umano della β -actina. L'amplificazione è riuscita, a dimostrazione del fatto che l'RNA isolato con il kit RNeasy DSP FFPE può essere utilizzato per analisi a valle.

L'utente deve ottimizzare il numero, lo spessore e l'area superficiale delle sezioni per il proprio campione di interesse e per ogni procedura successiva utilizzata nel proprio laboratorio oppure fare riferimento alle prestazioni specifiche della relativa analisi a valle.

	Tumore della mammella	Tumore del colon	Tumore del polmone	Melanoma	Pelle normale
RT-PCR 1 sezione	✓	✓	✓	✓	✓
RT-PCR 2 sezioni	✓	✓	✓	✓	✓

Figura 2. Amplificazione riuscita con RT-PCR di sezioni FFPE da 10 µm derivate per cinque tessuti umani differenti testati.

Stabilità dell'eluato

La stabilità dell'eluato dipende dal contenuto di impurità purificate congiuntamente e dal loro tipo (in relazione al tipo di tessuto), dal volume di eluizione e dalle condizioni di conservazione. Si raccomanda agli utenti di verificare la stabilità dell'eluato secondo i propri requisiti particolari.

La stabilità dell'eluato è stata testata per campioni di RNA umano derivati da FFPE tra -15 e -30°C e tra -60 e -90°C. Non è stato osservato nessun deterioramento fino a 12 settimane e gli eluati conservati a temperatura ambiente (18-25°C) sono stati stabili fino a 12 ore. Tutte le condizioni sono state valutate utilizzando RT-PCR avente come target il gene umano della β -actina.

Se il kit viene utilizzato unitamente ad applicazioni QIAGEN a valle, fare riferimento al relativo manuale per le istruzioni.

Ripetibilità

La ripetibilità è stata valutata utilizzando il campione FFPE di cellule ematiche umane nucleate. I campioni sono stati testati con un saggio validato internamente per un frammento di 295 bp del gene umano della β -actina su ciclatore PCR in tempo reale ABI® 7900.

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati 108 punti dati da tre lotti di estrazione (stesso lotto di kit, operatore, giorno). Nell'analisi statistica erano compresi il calcolo della deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) dei valori C_T derivati dalla RT-PCR della β -actina. La DS era 1,1 C_T e il coefficiente di variazione era pari al 4,1% (Tabella 1).

Tabella 1. Risultati della ripetibilità

	Ripetibilità		
	C_T medio	DS	CV (%)
Lotto 1	26,64	1,01	3,81
Lotto 2	27,51	1,16	4,2
Lotto 3	27,23	0,95	3,5
Lotto 1 + 2 + 3	27,13	1,11	4,07

Riproducibilità

La riproducibilità è stata eseguita valutando le estrazioni di RNA da campioni FFPE di cellule ematiche umane nucleate con operatori diversi, in giorni diversi e operatori e giorni diversi. I campioni sono stati testati con un saggio validato internamente per un frammento di 295 bp del gene umano della β -actina su ciclatore PCR in tempo reale ABI 7900. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati per ogni impostazione del test 108 punti dati da tre lotti di estrazione. Nell'analisi statistica erano compresi il calcolo della deviazione standard (DS) e il coefficiente di variazione (CV) dei valori C_T derivati dalla RT-PCR della β -actina (Tabella 2).

Tabella 2. Risultati della riproducibilità

	Riproducibilità		
	C_T medio	DS	CV (%)
Operatori diversi	26,92	1,06	3,95
Giorni diversi	26,56	1,20	4,53
Operatori e giorni diversi	26,63	1,01	3,78

Linearità

Il kit RNeasy DSP FFPE può essere utilizzato per l'isolamento dell'RNA da diversi tipi di tessuti FFPE. Il sistema è stato validato per l'utilizzo di 1–4 sezioni da cellule ematiche umane nucleate FFPE e ha evidenziato un incremento lineare della resa dell'RNA. Occorre stabilire un intervallo lineare sulla base dei requisiti del cliente e validarlo per quell'uso particolare. Si attendono intervalli lineari differenti per diversi tipi di tessuti, a seconda del carico di tessuto inserito nel sistema nonché delle caratteristiche del tessuto e delle analisi a valle.

Sostanze interferenti

Sostanze potenzialmente interferenti possono provenire da diverse fonti, ad es. metaboliti naturali specifici per il tipo di tessuto e l'organo, metaboliti prodotti durante condizioni patologiche, sostanze introdotte durante il trattamento del paziente o sostanze ingerite dal paziente. A causa della complessità delle sostanze potenzialmente interferenti e della diversa sensibilità delle specifiche applicazioni a valle, raccomandiamo agli utenti di valutare l'effetto delle sostanze interferenti per i propri sistemi e di validare un metodo per controllare l'interferenza nella propria specifica applicazione diagnostica a valle.

Non sono state osservate sostanze interferenti derivate da componenti del kit RNeasy DSP FFPE durante trattamento dei campioni ed estrazione dell'RNA.

Per maggiori informazioni sulle sostanze interferenti in specifiche applicazioni a valle QIAGEN, fare riferimento ai manuali dei kit.

Contaminazione crociata

Per valutare il livello di contaminazione crociata, 500 ng di RNA totale da sangue sono stati aggiunti alla soluzione di deparaffinazione e isolati in posizione adiacente a provette non contenenti RNA (provette negative di estrazione). Lo studio aveva lo scopo di simulare la situazione in cui campioni contenenti un elevato livello di molecole di RNA target possono provocare la contaminazione crociata di altri campioni durante la procedura di estrazione. La purificazione dell'RNA è stata condotta usando un lotto di reagenti. La contaminazione crociata è stata valutata utilizzando RT-PCR avente come target il gene umano della β -actina. I risultati non hanno mostrato alcuna contaminazione crociata nell'intero sistema.

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit QIAGEN specifico o il manuale utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Ordini www.qiagen.com/contact | Assistenza tecnica support.qiagen.com | Sito web www.qiagen.com