

2017. február

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue kit kézikönyv



1. verzió

IVD

In vitro diagnosztikai használatra.

CE

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden
NÉMETORSZÁG

R3 **MAT**

1062689HU



Tartalom

Alkalmazási terület	5
Összefoglalás és magyarázat	5
Az eljárás elve	6
Szállított anyagok.....	8
A kit tartalma	8
Szükséges, de nem biztosított anyagok.....	9
Figyelmeztetések és óvintézkedések	10
A reagensek tárolása és kezelése	11
A minták kezelése és tárolása	12
Eljárás	13
A pufferek előkészítése	14
Kiindulási anyag	15
A keresztszennyeződések megakadályozását célzó kezelési eljárások.....	16
Centrifugálás.....	17
A QIAamp MinElute oszlopok feldolgozása mikrocentrifugában.....	17
A tisztított DNS eluálása.....	18
Protokoll: Genomiális DNS izolálása FFPE szöveti metszetekből.....	19
Minőség-ellenőrzés	23
Korlátozások	23
Teljesítményjellemzők	24
Jelölések.....	24
Kapcsolatfelvételi adatok	25
Rendelési információk	26

Alkalmazási terület

A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit genomiális DNS formalinban fixált, paraffinba ágyazott (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) biológiai mintákból szilikagélmembrán-technika (QIAamp módszer) segítségével történő izolálására és tisztítására szolgál.

A termék in vitro diagnosztikai (IVD) célokra alkalmazott molekuláris biológiai technikák terén jártas szakmai felhasználók, például laboránsok és orvosok általi használatra készült; manuális minta-előkészítési célokra szolgál, sem kvalitatív, sem kvantitatív teszteredményeket nem nyújt.

Összefoglalás és magyarázat

A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit FFPE szöveti metszetekből származó DNS tisztítására szolgál. A kis mintamennyiségekben vagy mintaméretekben jelen lévő genomiális vagy mitokondriális DNS tisztításához a széles körben alkalmazott QIAamp DNA Micro technikát használja. A kit a szilikagél-alapú membrán szelektív kötési tulajdonságait kombinálja a rugalmasan megválasztható elúciós térfogatokkal.

A líziszhez alkalmazott körülmények lehetővé teszik a genomiális DNS hatékony tisztítását az FFPE szöveti metszetekből anélkül, hogy egész éjszakán át tartó inkubálásra lenne szükség. A proteináz K emésztés után, nagy hőmérsékleten végzett inkubálással részlegesen bonthatók a felszabadult DNS formalinnal alkotott keresztkötései, ami potenciálisan javítja a hozamot, valamint a további tesztek során a DNS-sel összefüggő teljesítményt. Az FFPE mintákból izolált DNS molekulatömege általában kisebb, mint a friss vagy fagyasztott mintákból származó DNS-é. A fragmentáció mértéke a minta típusától és korától, valamint a fixálási körülményektől függ.

A minta líziset követően az egyszerű QIAamp DSP DNA FFPE Tissue eljárással egyszerre több minta is feldolgozható.

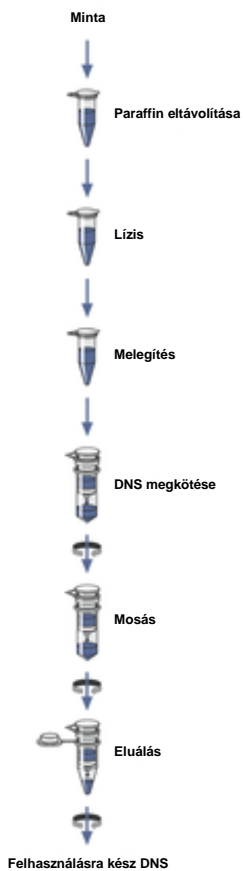
Azoknak a laboratóriumi eljárásoknak az esetében, amelyekre nem terjednek ki a kézikönyvben ismertetett QIAGEN teljesítményértékelő vizsgálatok, a felhasználónak kell elvégeznie a rendszer teljesítményének validálását.

Az eljárás elve

A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue eljárás hat lépésből áll (1. ábra):

- A paraffin eltávolítása: a paraffin feloldása xilolban, majd eltávolítása
- Lízisz: a minta lizálása proteináz K-val 56 °C-on, denaturáló körülmények között
- Melegítés: a 90 °C-on végzett inkubálás bontja a formalin keresztkötéseket
- Kötés: a DNS a membránhoz kötődik, az egyéb anyagok pedig átfolyanak
- Mosás: a visszamaradt szennyeződések kimosása
- Eluálás: a tiszta, tömény DNS kivonása a membránból

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



1. ábra: A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue eljárás

Szállított anyagok

A kit tartalma

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Katalógusszám			60404
Reakciók száma			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute oszlopok mosáshoz használandó csövekkel)	COL	50
WT	Wash Tubes (Mosócsövek) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (Elúciós csövek) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Líziscsövek) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Lízispuffer szövet lizálásához)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (Lízispuffer)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (concentrate) (1. mosópuffer [tömény])	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (concentrate) (2. mosópuffer [tömény])	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer† (Eluáló puffer)	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (Proteináz K)	PROTK	1,25 ml
–	Használati útmutató (kézikönyv)	H B	1

* Guanidinsót tartalmaz. Nem használható hipót tartalmazó fertőtlenítőszerrel. A figyelmeztetések és óvintézkedések a 10. oldalon találhatóak.

† Tartósítószerként nátrium-azidot tartalmaz.

Szükséges, de nem biztosított anyagok

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. További információkat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmazznak, amelyek az adott termék gyártójától szerezhetők be.

Reagensek

- xilol
- (96–100%-os) etanol*

Fogyóeszközök

- Ha úgy dönt, hogy nem használja a kitben mellékelt csöveket, a lízis lépéseihez 1,5 vagy 2 ml-es mikrocentrifuga-csövek, az eluálás lépéseihez 1,5 ml-es mikrocentrifuga-csövek használatát javasoljuk; beszerezhetőség: Eppendorf® (Safe-Lock: USA katalógusszám: 022363204; európai katalógusszám: 0030 120.086) vagy Sarstedt (katalógusszám: 72.690). DNáz-/RNáz-mentes, biztonsági kupakkal ellátott, kúp alakú csövek használatát javasoljuk.
- Pipetták és pipettahegyek (a keresztszennyeződések megakadályozása érdekében feltétlenül aeroszol részecskék elleni szűrővel ellátott pipettahegyek használatát javasoljuk)

Eszközök

- ThermoMixer termosztatikus keverő†, fűthető rázó (orbitális) inkubátor, az inkubáláshoz 56, 70 és 90 °C-ot biztosítani képes fűtőblokk vagy vízfürdő
- Mikrocentrifuga† rotorral, 2 ml-es csövekhez
- Vortex keverő

* Ne használjon denaturált alkoholt; a denaturált alkohol más anyagokat, például metanolt vagy metil-etil-ketont is tartalmaz.

† Annak biztosítása érdekében, hogy a QIAamp DSP DNA FFPE eljárások során megfelelő legyen a minták feldolgozása, feltétlenül javasoljuk a készülékek gyártó ajánlásai szerinti kalibrálását.

Figyelmeztetések és óvintézkedések

In vitro diagnosztikai használatra.

Vegyszerhasználat során mindig viseljen megfelelő laboratóriumi köpenyt, egyszer használatos kesztyűt és védőszemüveget. A további tudnivalókat a megfelelő biztonsági adatlapok (SDS-ek) tartalmazzák. Ezek elérhetők online, a www.qiagen.com/safety weboldalon, jól kezelhető, kompakt PDF formátumban; a weboldalon megtalálható, megtekinthető és kinyomtatható az egyes QIAGEN® kitek és kitben található komponensek biztonsági adatlapja.



FIGYELEM: SOHA NE adjon hipót vagy savas oldatot közvetlenül a minta-előkészítés hulladékához.

Az AL puffer és az AW1 puffer guanidin-hidrokloridot tartalmaz, amely hipóval keverve rendkívül reakcióképes vegyületeket képez.

Ha ilyen puffereket tartalmazó folyadék folyik ki, megfelelő laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel kell feltakarítani. Ha a kifolyt folyadék potenciálisan fertőző anyagot tartalmaz, az érintett felületet először laboratóriumi tisztítószerrel és vízzel tisztítsa meg, majd 1 tf%-os nátrium-hipoklorit oldattal.

A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit komponenseire a következő figyelmeztető és óvintézkedésre vonatkozó mondatok érvényesek.

AL puffer



A készítmény guanidin-hidrokloridot és maleinsavat tartalmaz. Figyelem! Lenyelve vagy belélegezve ártalmas. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Allergiás bőrreakciót válthat ki. Ha a szemirritáció nem múlik el: orvosi ellátást kell kérni. **SZEMBE KERÜLÉS ESETÉN:** Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. **HA BŐRRE KERÜL:** Óvatos lemosás bő szappanos vízzel. Bőrirritáció esetén: orvosi ellátást kell kérni. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

ATL puffer



Figyelem! Enyhén bőrirritáló hatású. Bőrirritáció esetén: orvosi ellátást kell kérni.

AW1 puffer



Guanidin-hidrokloridot tartalmaz. Figyelem! Lenyelve vagy belélegezve ártalmas. Bőrirritáló hatású. Súlyos szemirritációt okoz. Rosszullét esetén forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. A tartalom és az edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékfeldolgozó telepen. A szennyezett ruhát le kell vetni és az újbóli használat előtt ki kell mosni. Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használata kötelező.

Proteináz K



Proteináz K-t tartalmaz. Veszély! Enyhén bőrirritáló hatású. Belélegezve allergiás és asztmás tüneteket, és nehéz légzést okozhat. Kerülje a por/füst/gáz/köd/gőzök/permet belélegzését. A tartalom és az edény elhelyezése hulladékként: jóváhagyott hulladékfeldolgozó telepen. Légzési problémák esetén: Forduljon TOXIKOLÓGIAI KÖZPONTHOZ vagy orvoshoz. **BELÉLEGZÉS ESETÉN:** Légzési nehézségek esetén az érintett személyt friss levegőre kell vinni és olyan nyugalmi testhelyzetbe kell helyezni, hogy könnyen tudjon lélegezni. Légzésvédelem használata kötelező.

A reagensek tárolása és kezelése

A QIAamp MinElute oszlopokat az átvételüket követően 2–8 °C-on kell tárolni; az oszlopok a kit dobozán feltüntetett lejárati dátumig használhatók.

Minden puffer szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) tárolható; stabilitásukat a kit lejárati dátumáig megőrzik. A feloldott AW1 és AW2 puffer szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) a kit lejárati dátumáig, de legfeljebb 1 évig tárolható.

A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit használatra kész proteináz K oldatot tartalmaz, amelyet speciális tárolópufferben szállítunk. A proteináz K szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) tárolva a kit lejáratí dátumáig megőrzi a stabilitását.

A minták kezelése és tárolása

A DNS-fragmentáció mértékének korlátozása céljából standard formalinos fixálási és paraffinbeágyazási eljárásokat kell használni; ügyeljen a következőkre:

- A szövetminták formalinban való fixálását a sebészeti eltávolítást követően a lehető legrövidebb időn belül végezze el, a laboratóriumi protokollnak megfelelően (10%-os neutrális pufferelt formalin oldat általánosan elfogadott).
- 14–24 óra fixálási időt alkalmazzon. Korlátozza a fixálási időt, mert az elhúzódó (például a 24 órát meghaladó) fixálás fokozottabb DNS-fragmentációt okozhat, csökkentve a további tesztek során elérhető teljesítményt.
- A mintákat a beágyazás előtt alaposan dehidratálja (a visszamaradt formalin gátolhatja a proteináz K emésztést).

A DNS az ATE pufferben való eluálást követően azonnal felhasználható amplifikációs reakciókban, vagy tárolható (a felhasználói követelményektől függő körülmények között). A további egyes QIAGEN alkalmazásokhoz ajánlott tárolási körülményeket a megfelelő kitek kézikönyve tartalmazza.

Eljárás

A kezdés előtt figyelembe veendő fontos szempontok

- A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kitben mellékelte valamennyi reagens kizárólag az ugyanabban a QIAamp DSP DNA FFPE kitben található többi reagenssel használható. Az optimális teljesítőképesség fenntartása érdekében a kitben lévő reagentumok semmilyen más reagenssel nem helyettesíthetők.
- A kit átvételét követően ellenőrizze, hogy a kit komponensei nincsenek-e megsérülve. Ha a csomagok vagy a puffert tartalmazó üvegek sérültek, forduljon a QIAGEN műszaki ügyfélszolgálatához vagy a területileg illetékes forgalmazóhoz. A véletlenül kifolytak a folyadékok, lásd „Figyelmeztetések és óvintézkedések” (10. oldal). Ne használja a kit sérült komponenseit, mivel a használatuk csökkentheti a kit teljesítőképességét.
- Az aktuálisan használt kithoz csak akkor használhat más kitből származó komponenseket, ha a kitek tételszáma megegyezik.
- Ügyeljen arra, hogy a kitben lévő reagentumokat ne érje mikrobiológiai szennyeződés.
- A kithet kizárólag az in vitro laboratóriumi diagnosztikai módszerekben jártas szakemberek használhatják.
- A bőrfelületről vagy a poros laboratóriumi eszközökről származó szennyeződések átvitelének megakadályozása céljából a reagentumok és minták kezelésekor mindig viseljen latex- vagy vinilkesztyűt. A kéz és a porreszecskek a rajtuk/bennük jelen lévő baktériumok és penészgombák miatt általános szennyezőforrásnak számítanak. Gyakran váltson kesztyűt, és a csöveket tartsa lezárva.
- A megmaradt puffereket, átfolyó frakciót és mintamaradékokat a helyi eljárásoknak megfelelően kell ártalmatlanítani.
- A laboratóriumi műanyag eszközök használatakor a tisztítási eljárás során DNáz-/RNáz-mentes, gyenge kötési képességű, polipropilénből készült, biztonsági kupakkal ellátott 1,5–2 ml-es, kúp alakú, egyszer használatos csövek használatát javasoljuk.

- Minden centrifugálási lépést szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) végezzen.
- Minden puffer szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) tárolható; a puffereket használat előtt alaposan fel kell keverni.
- A 11. lépésben leírt művelethez állítson be 56 °C-ra egy termosztatikus keverőt vagy egy fűthető rázó (körkörös mozgású) inkubátort. Ha nem áll rendelkezésre termosztatikus keverő vagy fűthető rázó (körkörös mozgású) inkubátor, fűtőblokk vagy vízfürdő is használható.
- Ha az AL puffer vagy az ATL puffer csapadékot tartalmaz, a csapadék feloldásához melegítse fel a puffert 70 °C-ra, és óvatosan kevergesse.
- Az AW1 puffer és az AW2 puffer előkészítését feltétlenül az alábbi útmutatás szerint végezze.
- A QIAGEN a minőség-ellenőrzési eljárásai részeként a forgalomba hozatal előtt mindegyik kit-tételnél funkcionális vizsgálatokat végez. Ezért ne keverje sem a különböző tételekből származó kitek reagenseit, sem a különböző reagenstételekből származó reagenseket.

A pufferek előkészítése

Az ATL puffer előkészítése

- Az eljárás megkezdése előtt ellenőrizze, hogy nem képződött-e csapadék az ATL pufferben. Szükség esetén a puffert 70 °C-ra melegítve, óvatos kevergetés mellett oldja fel a csapadékot.

Az AL puffer előkészítése

- Az eljárás megkezdése előtt ellenőrizze, hogy nem képződött-e csapadék az AL pufferben. Szükség esetén a puffert 70 °C-ra melegítve, óvatos kevergetés mellett oldja fel a csapadékot.

Az AW1 puffer előkészítése

- Adjon a 19 ml tömény AW1 puffert tartalmazó üveghez 25 ml (96–100%-os) etanolt. Az üveg címkéjén lévő jelölőnégyzet bejelölésével jelezze, hogy megtörtént az etanol hozzáadása. A feloldott AW1 puffer a kit lejáratási dátumáig, de legfeljebb 1 évig tárolható szobahőmérsékleten (15–25 °C-on). Javasoljuk, hogy írja rá a puffer címkéjére a feloldás dátumát.

Megjegyzés: Az eljárás megkezdése előtt rázással keverje fel a feloldott AW1 puffert.

Az AW2 puffer előkészítése

- Adjon a 13 ml tömény AW2 puffert tartalmazó üveghez 30 ml (96–100%-os) etanolt. Az üveg címkéjén lévő jelölőnégyzet bejelölésével jelezze, hogy megtörtént az etanol hozzáadása. A feloldott AW2 puffer a kit lejáratási dátumáig, de legfeljebb 1 évig tárolható szobahőmérsékleten (15–25 °C-on). Javasoljuk, hogy írja rá a puffer címkéjére a feloldás dátumát.

Megjegyzés: Az eljárás megkezdése előtt rázással keverje fel a feloldott AW2 puffert.

Kiindulási anyag

A DNS-tisztítás kiindulási anyaga FFPE szövetmintákból (ideális esetben frissen) készült metszetek. Egy preparátumban több metszet is kombinálható. Ha nincsenek információi a kiindulási anyag fajtájáról, azt javasoljuk, hogy preparátumonként legfeljebb három metszetet használjon.

A felhasználónak a laboratóriumban használt eljárásokhoz kell optimalizálnia a metszetek számát, vastagságát és területét. A kit további (downstream) QIAGEN alkalmazáshoz való használata esetében az útmutatást a vonatkozó kézikönyvben találja.

A keresztzennyeződések megakadályozását célzó kezelési eljárások

A nukleinsav-amplifikációs technikák érzékenysége miatt a QIAamp MinElute oszlopok kezelésekor a következő óvintézkedésekkel kerülhető el a minták közötti keresztzennyeződés:

- Ne töltse túl a csöveket szövetmintával.
- A szövet metszésekor cseréljen kést az egyes minták között.
- Óvatosan vigye fel a mintát vagy az oldatot a QIAamp MinElute oszlopra. Amikor a mintát a QIAamp MinElute oszlopra pipettázza, ügyeljen arra, hogy ne nedvesítse meg az oszlop peremét.
- Az egyes folyadékátvitelek között mindig cseréljen pipettahegyet. Aeroszol részecskék elleni szűrővel ellátott pipettahegyek használatát javasoljuk.
- A mintamosási lépések során a mosáshoz mindig új csöveket használjon.
- A keverés és a centrifugálás előtt gondoskodjon arról, hogy a csövek teljesen le legyenek zárva a kupakjukkal.
- A centrifugálás előtt gondoskodjon arról, hogy a QIAamp MinElute oszlop teljesen le legyen zárva.
- A kupakok belsejében lévő cseppek eltávolítása céljából minden rövid vortexelési lépés és 90 °C-os inkubálási lépés után rövid ideig centrifugázza a mikrocentrifuga-csőveket.
- Egyszerre csak egy QIAamp MinElute oszlopot nyisson ki, és ügyeljen arra, hogy ne képződjenek aeroszol részecskék.
- A minták között mindig cseréljen kést.
- Az egyes folyadékátvitelek között mindig cseréljen pipettahegyet. A keresztzennyeződések minimalizálása érdekében azt javasoljuk, hogy aeroszol részecskék elleni szűrővel ellátott pipettahegyeket használjon, de ne használjon ismétlődő pipettákat.
- Mindig egyszer használatos kesztyűt használjon, amelyet rendszeresen ellenőrizzen, hogy nem szennyeződött-e a mintával. Ha felmerül a kesztyű szennyeződésének gyanúja, dobja ki a kesztyűt.
- Egyszerre csak egy csövet nyisson ki.

Centrifugálás

A QIAamp MinElute oszlopok beleillenek a legtöbb 1,5–2 ml-es standard mikrocentrifugacsőbe. További 2 ml-es mosócsövek külön rendelhetők (QIAGEN katalógusszám: 19201). A QIAamp MinElute oszlopok centrifugálása a centrifuga zajának csökkentése céljából körülbelül 6000 x g-n történik. A maximális sebességgel történő centrifugálás nem növeli a DNS-hozamot. A QIAamp MinElute oszlopokat azonban az eljárás két lépésében is maximális sebességgel kell centrifugálni: a membránok mosását követő száraz centrifugáláskor és az eluáláskor. A centrifugálást a minta xilolos kezelést és etanolos mosást követő kinyeréséhez is maximális sebességgel kell végezni.

Minden centrifugálási lépést szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) kell végezni. Az alacsony hőmérsékleten végzett centrifugálás az optimálisnál gyengébb extrakcióhoz vezethet.

A QIAamp MinElute oszlopok feldolgozása mikrocentrifugában

- A QIAamp MinElute oszlopokat a centrifugába helyezésük előtt mindig zárja le.
- Ne érjen hozzá a pipetta hegyével a QIAamp MinElute oszlop membránjához.
- Az átfolyó frakciók veszélyes hulladékot tartalmazhatnak, ezért ezeket megfelelő módon ártalmatlanítani kell.
- Több minta hatékony párhuzamos feldolgozásához azt javasoljuk, hogy töltsön meg egy racket (tartórekeszt) mosócsövekkel, amelyekbe a centrifugálás után áthelyezi a QIAamp MinElute oszlopokat. Az átfolyó frakciókat tartalmazó használt mosócsövek kidobhatók, és a QIAamp MinElute oszlopokat tartalmazó új mosócsövek közvetlenül behelyezhetők a mikrocentrifugába.
- Ügyeljen arra, hogy az eljárás során végig megmaradjon a minták teljes nyomon követhetősége.

A tisztított DNS eluálása

Az olyan további (downstream) alkalmazások esetében, amelyeknél kis kiindulási térfogatokra van szükség (például egyes PCR tesztek esetében), a töményebb eluátum növelheti ugyan a teszt érzékenységét, de a potenciális inhibitorok koncentrációját is megnövelheti.

Az elúciós térfogat növelése csökkenti az eluátumban jelen lévő DNS koncentrációját.

A visszanyert eluátum térfogata körülbelül 5 µl-rel lehet kisebb a QIAamp MinElute oszlopra felvitt ATE puffer térfogatánál. 20 µl elúciós térfogat például legalább 15 µl eluátumot eredményez. A visszanyert eluátum térfogata a minta fajtájától függ.

A felhasználó feladata, hogy a laboratóriumban alkalmazott eljárásokhoz optimalizálja az elúciós térfogatot. A további egyes QIAGEN alkalmazásokhoz ajánlott elúciós térfogatok a kitek kézikönyve tartalmazza.

Az oszlop centrifugálás előtti, ATE pufferrel szobahőmérsékleten, körülbelül 5 percen át végzett inkubálásával növelhetők a hozamok. Az eluált DNS a kitez részeként szállított, 1,5 ml-es elúciós csövekbe gyűjthető. Az eluált DNS tárolási körülményei a felhasználó által meghatározott követelményektől függenek. A további egyes QIAGEN alkalmazásokhoz ajánlott tárolási körülményeket a kitek kézikönyve tartalmazza.

Protokoll: Genomiális DNS izolálása FFPE szöveti metszetekből

Eljárás

1. Késsel vágja le a mintablokkról a paraffinfelesleget.
2. A standard laboratóriumi gyakorlat (lásd „Kiindulási anyag”, 15. oldal) szerint készítsen (vágjon) metszeteket. A felhasználónak a laboratóriumban használt eljárásokhoz kell optimalizálnia a metszetek számát, vastagságát és területét. Ügyeljen arra, hogy a minták nyomon követhetősége a teljes eljárás során megmaradjon.
3. Steril késsel azonnal vágja le a szöveteket a metszetekről egy líziscsőbe (a kit része). Ügyeljen arra, hogy az összes rendelkezésre álló szövetet átvigye a csőbe. Adjon a mintához 1 ml xilolt, zárja le a csövet a kupakkal, és vortex keverővel erőteljesen addig keverje, amíg a paraffin fel nem oldódik (körülbelül 10 s). Ügyeljen arra, hogy a cső jól le legyen zárva, megakadályozva ezáltal a xilol kifolyását, a minták keresztzennyeződését és a xilollal való esetleges érintkezését.

Megjegyzés: A xilolt elszívó fülke alatt vagy más, megfelelő elhatárolást biztosító készüléket alkalmazva használja.

4. Szobahőmérsékleten maximális sebességgel körülbelül 2 percen át centrifugálva gyűjtse össze a szövetpelletet. Ha nem képződött szövetpellet, ismétlje meg ezt a lépést.

Megjegyzés: Az alacsony hőmérsékleten végzett centrifugálás az optimálisnál gyengébb extrakcióhoz vezethet.

5. Pipettázással távolítsa el és dobja ki a felülúszót. Gyűjtse össze a pelletet.

A felülúszó veszélyes hulladéknak számító xilolt tartalmaz, amelyet a helyi rendeletek szerint, megfelelően ártalmatlanítani kell.

6. Adjon a szövetpellethez 1 ml (96–100%-os) etanolt, és alaposan keverje össze vortex keverővel.

Az etanol kivonja a mintából a maradék xilolt; az extrakció után megfelelően ártalmatlanítani kell.

7. Centrifugálja a mintát szobahőmérsékleten maximális sebességgel körülbelül 2 percen át.

Pipettázással távolítsa el a felülúszót. Vigyázzon, hogy a pelletből ne kerüljön a pipettába.

Óvatosan, vékony pipettahegyet használva távolítsa el a maradék etanolt. Nyissa ki a csövet, és 15–40 °C-on inkubálva párologtassa el az összes maradék etanol.

A maradék etanol eltávolítása az extrakció sikerének alapvető feltétele.

Megjegyzés: Az alacsonyabb inkubációs hőmérséklet növeli a párolgási időt, míg magasabb hőmérséklet esetén kiszáradhat a pellet, ami megnehezíti a szuszpendálását.

8. 180 µl ATL pufferben reszuszpendálja a pelletet. Adjon hozzá 20 µl proteináz K-t, és vortex keverővel keverje.

Megjegyzés: A maximális hozamú kinyerés biztosításához fontos a pellet megfelelő reszuszpendálása az ATL pufferben.

9. Inkubálja a mintát körülbelül 1 órán át 56 ± 3 °C-on (amíg le nem játszódik a minta lízise).

10. Inkubálja a mintát 1 óra ± 5 percen keresztül 90 ± 5 °C-on.

Az ATL pufferben, 90 °C-on végzett inkubálás részben visszafordítja a nukleinsavak formaldehid hatására bekövetkező módosulását. A rövidebb inkubációs idők vagy az alacsonyabb inkubációs hőmérsékletek befolyásolhatják a DNS minőségét és mennyiségét. Egyetlen fűtőblokk használatakor az 56 °C-on végzett inkubálást követően hagyja a mintát szobahőmérsékleten, amíg a fűtőblokk hőmérséklete el nem éri a 90 °C-ot.

11. A kupak belsejében lévő cseppek eltávolítása céljából rövid ideig centrifugálja a csövet.

12. Adjon a mintához 200 µl AL puffert, és alaposan keverje össze vortex keverővel.

Ezután adjon a keverékhez 200 µl (96–100%-os) etanolt, és ismét alaposan keverje össze vortex keverővel.

A homogén oldat kinyerése szempontjából nagyon fontos a minta, az AL puffer és az etanol vortex keverővel vagy pipettázással történő azonnali és alapos összekeverése. Több minta feldolgozása esetén időmegtakarítás céljából előre össze lehet keverni az AL puffert és az etanolt, és úgy hozzáadni egy lépésben a mintákhoz. Az AL puffer és az etanol hozzáadásakor fehér csapadék képződhet. Ez a csapadék nem befolyásolja a QIAamp eljárást. Mindig friss keveréket használjon, és használat után azonnal dobja ki a maradékot.

13. A kupak belsejében lévő cseppek eltávolítása céljából rövid ideig centrifugálja a csövet.

14. Óvatosan vigye át a teljes lizátumot (egy 2 ml-es mosócsőbe helyezett) QIAamp MinElute oszlopra, ügyelve arra, hogy ne nedvesítse meg az oszlop peremét, majd a kupakkal zárja le a csövet, és körülbelül 6000 x g-n legalább 1 percig centrifugálja. Helyezze a QIAamp MinElute oszlopot egy 2 ml-es tiszta mosócsőbe (a kit tartalmazza), és dobja ki az átfolyt frakciót tartalmazó mosócsövet.

Ha a centrifugálást követően nem ment át a teljes lizátum a membránon, addig ismételje a centrifugálást nagyobb sebességen, amíg a QIAamp MinElute oszlop ki nem ürül.

15. Óvatosan nyissa ki a QIAamp MinElute oszlopot, és adjon hozzá 500 µl feloldott AW1 puffert, ügyelve arra, hogy ne nedvesítse meg az oszlop peremét. Zárja le a kupakkal az oszlopot, és körülbelül 6000 x g-n legalább 1 percig centrifugálja. Helyezze a QIAamp MinElute oszlopot egy 2 ml-es tiszta mosócsőbe, és dobja ki az átfolyt frakciót tartalmazó mosócsövet.

16. Óvatosan nyissa ki a QIAamp MinElute oszlopot, és adjon hozzá 500 µl feloldott AW2 puffert, ügyelve arra, hogy ne nedvesítse meg az oszlop peremét. Zárja le a kupakkal az oszlopot, és körülbelül 6000 x g-n legalább 1 percig centrifugálja. Helyezze a QIAamp MinElute oszlopot egy 2 ml-es tiszta mosócsőbe, és dobja ki az átfolyt frakciót tartalmazó mosócsövet.

Ügyeljen arra, hogy a QIAamp MinElute oszlop ne érintkezzen az átfolyó frakcióval. Ellenőrizze, hogy a centrifuga rotorja ki van-e egyensúlyozva. Előfordulhat, hogy egyes centrifugák rotorja rázkódik a lassulás során, aminek következtében az etanolt tartalmazó átfolyt frakció érintkezhet a QIAamp MinElute oszloppal. Óvatosan vegye ki a QIAamp MinElute oszlopot és a mosócsövet a rotorból, nehogy az átfolyt frakció érintkezzen a QIAamp MinElute oszloppal.

17. Körülbelül 3 percig maximális sebességgel (körülbelül 20 000 x *g*-n) centrifugálva szárítsa meg a membránt.

Az eluátumba jutó etanol zavaró hatással lehet egyes további alkalmazásokra.

18. Helyezze a QIAamp MinElute oszlopot egy 1,5 ml-es tiszta elúciós csőbe (a kit tartalmazza), és dobja ki az átfolyt frakciót tartalmazó mosócsövet. Óvatosan nyissa fel a QIAamp MinElute oszlop kupakját, és vigyen fel 20–200 µl ATE puffert a membrán közepére.

FONTOS: Kis (<50 µl) elúciós térfogatok használata esetén a megkötött DNS teljes eluálódásának biztosításához az ATE puffert a membrán közepére adagolja. Az elúciós térfogat kiválasztását tekintve a QIAamp MinElute oszlopok rugalmasságot biztosítanak. A térfogatot a további alkalmazáshoz meghatározott követelmények alapján válassza ki. Az eluátum térfogata körülbelül 5 µl-rel kisebb az oszlopra felvitt eluáló oldat térfogatánál.

19. Zárja le a kupakkal az oszlopot, és inkubálja szobahőmérsékleten (15–25 °C-on) legalább 1 percig. Maximális sebességgel (körülbelül 20 000 x *g*-n) centrifugálja legalább 1 percig.

Az ATE pufferrel megtöltött QIAamp MinElute oszlop centrifugálás előtt inkubálása (szobahőmérsékleten, körülbelül 5 percig) növelheti a DNS-hozamot.

Minőség-ellenőrzés

A QIAGEN ISO-minősített minőségirányítási rendszerének megfelelően a QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kitek minden egyes gyártási tétele esetében ellenőrizzük az előre meghatározott specifikációknak való megfelelést, ezzel biztosítva a termék egyenletes és kifogástalan minőségét.

Korlátozások

A kit teljesítményének meghatározásához genomiális DNS-t izoláltunk formalinban fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) szövetekből.

Azoknak a laboratóriumi eljárásoknak az esetében, amelyekre nem terjednek ki a kézikönyvben ismertetett QIAGEN teljesítményértékelő vizsgálatok, a felhasználónak kell elvégeznie a rendszer teljesítményének validálását.

A diagnosztikai eredményeket negatívan befolyásoló hatások kockázatának minimalizálása érdekében a további alkalmazásokhoz megfelelő kontrollokat kell használni. A további validáláshoz az International Conference on Harmonization of Technical Requirements (A Műszaki Követelményeket Meghatározó Nemzetközi Harmonizációs Konferencia [ICH]) által kidolgozott ICH Q2(R1) jelű, Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Analitikai módszerek validálása: szöveg és módszertan) című dokumentumban szereplő irányelveket javasoljuk alkalmazni.

A kapott diagnosztikai eredményeket mindig az egyéb klinikai vagy laboratóriumi leletekkel összefüggésben kell értelmezni.











A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit használata során a DNS-sel együtt a mintában esetleg jelen lévő RNS is tisztításra kerül.

Teljesítményjellemzők

A QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit teljesítményjellemzőit lásd www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE.











Jelölések

A csomagoláson és a címkéken a következő jelölések szerepelhetnek:

Jelölés	A jelölés jelentése
 Σ <N>	<N> reakcióhoz elegendő reagenst tartalmaz
	Lejárat
	In vitro diagnosztikai orvostechikai eszköz
	Az áru beérkezését követően
	Katalógusszám
	Tételszám
	Anyagszám
	Komponensek
	Tartalom
	Szám

Jelölés

A jelölés jelentése

	Az etanol üvegbe töltése után írja rá az aktuális dátumot
	Etanol
	Hozzáadás
	Guanidin-hidroklorid
	Maleinsav
	Globális kereskedelmi áruazonosító szám (GTIN)
	Hőmérsékleti korlát
	Gyártó
	Lásd a használati utasítást
	Figyelem!

Kapcsolatfelvételi adatok

Műszaki segítségnyújtásért és további információkért tekintse meg műszaki ügyfélszolgálatunk weblapját a www.qiagen.com/Support címen, hívja a 00800-22-44-6000 telefonszámot, vagy forduljon a QIAGEN valamelyik műszaki szervizosztályához vagy a területileg illetékes forgalmazóhoz (lásd a hátsó borítón vagy a www.qiagen.com webhelyen).

Rendelési információk

Termék	Tartalom	Katalógusszám
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – genomiális DNS tisztítására paraffinba ágyazott szövetekből		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	50 DNS-preparáláshoz: 50 QIAamp MinElute® oszlop, proteínáz K, pufferek, (2 ml-es) mosócsövek, (1,5 ml-es) elúciós csövek, (2 ml-es) líziscsövek	60404

A licenccel kapcsolatos legfrissebb információk és a termékspecifikus jogi nyilatkozatok a megfelelő QIAGEN kit kézikönyvében vagy felhasználói útmutatójában található. A QIAGEN kitek kézikönyvei és felhasználói útmutatói a **www.qiagen.com** webhelyen érhetők el, vagy a QIAGEN Műszaki ügyfélszolgálatától vagy a területileg illetékes forgalmazótól szerezhetők be.

Védjegyek: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Csoport); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Korlátozott licencszerződés a QIAamp DSP DNA FFPE Tissue kit kézikönyvhöz

A termék használatával a termék vásárlója vagy felhasználója elfogadja a következő feltételeket:

1. A terméket kizárólag a hozzá tartozó protokollok és a jelen kézikönyv szerint, valamint a panelhez tartozó komponensekkel együtt szabad használni. A QIAGEN a szellemi tulajdonát képező termékek egyikének esetében sem engedélyezi, hogy a panelhez tartozó komponenseket a termékhez mellékelte protokollokban, a jelen kézikönyvben és a www.qiagen.com webhelyen elérhető további protokollokban leírtak kivételével más, nem a panelhez tartozó komponensekbe beépítsék vagy azokkal együtt használják. A további protokollok némelyikét a QIAGEN felhasználói bocsátják más QIAGEN felhasználók rendelkezésére. A QIAGEN nem végezte el ezeknek a protokolloknak az alapos vizsgálatát és optimalizálását. A QIAGEN nem vállal garanciát ezekért a protokollokért, és nem garantálja azt sem, hogy azok nem sértenek harmadik felek jogait.
2. Az itt leírt licenccen kívül a QIAGEN nem vállal garanciát arra, hogy ez a panel és/vagy ennek használata nem sérti harmadik felek jogait.
3. A panel és komponenseinek licence csak egyszeri használatra jogosít; újrafelhasználásuk, felújításuk vagy újraértékesítésük tilos.
4. A QIAGEN az itt leírtakon kívül kifejezetten kizár minden más konkrét vagy vélelmezett jogot.
5. A panel vásárlója és felhasználója elfogadja, hogy semmilyen olyan lépést nem tesz, és másnak sem engedélyezi semmilyen olyan lépés megtételét, amely a fentiekben előírtak megszegéséhez vezet vagy azt elősegíti. A QIAGEN jogosult a jelen korlátozott licencszerződésben foglalt tilalmak bármely bíróságon keresztül érvényesítésére és az azzal kapcsolatban felmerülő összes vizsgálati és perköltség követelésére, beleértve a korlátozott licencre vonatkozó jelen szerződés vagy a panellel és/vagy komponenseivel kapcsolatos bármilyen szellemi tulajdonjog érvényesítése céljából indított peres eljárás ügyvédi költségeit.

A legújabb licencfeltételekről a www.qiagen.com webhelyen tájékozódhat.

Feb-17 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, minden jog fenntartva.

Rendelés: www.qiagen.com/contact | Műszaki támogatás: support.qiagen.com | Webhely: www.qiagen.com