

2017. gada decembris

# QIAsymphony<sup>®</sup> SP protokola lapa

Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP un Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

Šis dokuments ir Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP un Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP QIAsymphony SP protokola lapa, R3, QIAsymphony DSP DNA Mini Kit versijai 1.

## Vispārīga informācija

QIASymphony DSP DNA Kit ir paredzēts lietošanai in vitro diagnostikā.

Šie protokoli ir paredzēti kopējās DNS attīrīšanai no audiem un formalinā fiksētiem un parafinā iegultiem (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) audiem, izmantojot sistēmu QIASymphony SP un QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Atkarībā no parauga veida ieteicams izmantot zema satura (low content, LC) vai augsta satura (high content, HC) protokolu. Audi nodrošinās palielinātu DNS daudzumu, ja tiks apstrādāti ar augsta satura protokolu, savukārt zema satura protokolu var izmantot kopā ar mazu eluāta tilpumu (50 µl), ja ir nepieciešama augsta DNS koncentrācija. Darbā ar FFPE audiem ieteicams izmantot zema satura protokolu.

### Zema satura protokols

<b>Komplekts</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr. 937236)
<b>Parauga materiāls</b>	FFPE audi un audi* Vienā preparātā var apvienot līdz pat 4 FFPE audu daļām, kur katras daļas biezums nepārsniedz 10 µm, vai līdz 8 daļām, kur katras daļas biezums nepārsniedz 5 µm un virsmas laukums nepārsniedz 250 mm <sup>2</sup> .
<b>Protokola nosaukums</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Noklusējuma testu kontrolšķīdumu komplekts</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Eluāta tilpums</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl vai 400 µl
<b>Nepieciešamā programmatūras versija</b>	Versija 4.0 vai jaunāka

\* Informāciju par audu paraugiem skatiet augstas koncentrācijas protokola sadaļā.

### Augsta satura protokols

<b>Komplekts</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (kat. nr. 937236)
<b>Parauga materiāls</b>	Audi Ja informācija par paredzamo ieguves apjomu nav pieejama, ieteicams sākt darbu ar 25 mg parauga materiāla. Atkarībā no ieguves apjoma parauga lielumu turpmākajos preparātos var palielināt.
<b>Protokola nosaukums</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Noklusējuma testu kontrolšķīdumu komplekts</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Eluāta tilpums</b>	100 µl, 200 µl vai 400 µl
<b>Nepieciešamā programmatūras versija</b>	Versija 4.0 vai jaunāka

## Nepieciešamie materiāli, kas netiek piegādāti

### Visiem paraugu veidiem

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (Buferšķīdums ATL, 4 x 50 ml) (kat. nr. 939016)
- Lai līdz minimumam samazinātu RNS saturu: DNase-free RNase A (RNāze bez DNāzes, rezerves standartšķīdums 100 mg/ml)

### FFPE audiem (deparafinizācija bez ksilola)

- Deparaffinization Solution (Deparafinizācijas šķīdums) (kat. nr. 939018)

### FFPE audiem (deparafinizācija ar ksilolu)

- Ksilols (99–100%)
- Etanols (96–100%)\*

## Nodalījums “Sample” (Paraugs)

<b>Parauga veids</b>	FFPE audi un audi
<b>Parauga ievades tilpums</b>	220 µl (nepieciešamais katra parauga tilpums katrā protokolā) <sup>†</sup>
<b>Apstrādāta parauga tilpums</b>	200 µl
<b>Primārie paraugu stobriņi</b>	N/p
<b>Sekundārie paraugu stobriņi</b>	Papildinformāciju skatiet vietnē <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
<b>Ieliktni</b>	Atkarīgs no izmantotā paraugu stobriņa veida; papildinformāciju skatiet vietnē <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

<sup>†</sup> Gan augsta, gan zema satura protokolu gadījumā sistēma neatpazīs paraugu, kura tilpums ir mazāks par 220 µl, jo paraugu pārvešana tiek veikta bez šķidrums līmeņa noteikšanas. Tādēļ gādājiet, lai parauga ievades tilpums būtu 220 µl. N/p = nav piemērojams.

## Nodalījums “Reagents and Consumables” (Reāģenti un izejmateriāli)

<b>Pozīcija A1 un/vai A2</b>	Reāģentu kasetne
<b>Pozīcija B1</b>	N/p
<b>Uzgaļu stabiņa turētājs 1–17</b>	Vienreiz lietojami filtra uzgaļi, 200 µl vai 1500 µl
<b>Ierīces bloka turētājs 1–4</b>	Ierīču bloki ar paraugu sagatavošanas kasetnēm vai 8 stieņu pārsegumiem

N/p = nav piemērojams.

\* Neizmantojiet denaturētu spirtu, kas satur papildvielas, piemēram, metanolu vai metilētilketonu.

## Nodalījums "Waste" (Atkritumi)

Ierīces bloka turētājs 1–4	Tukši ierīču bloki
Atkritumu maisa turētājs	Atkritumu maiss
Šķidro atkritumu pudeles turētājs	Tukša šķidro atkritumu pudele

## Nodalījums "Eluate" (Eluāts)

Eluēšanas statīvs (ieteicams izmantot 1. atveri dzesēšanas pozīcijā)	Papildinformāciju skatiet vietnē <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
--	---

## Nepieciešamie plastmasas piederumi

Plastmasas piederumi	Viena sērija, 24 paraugi*	Divas sērijas, 48 paraugi*	Trīs sērijas, 72 paraugi*	Četras sērijas, 96 paraugi*
Vienreiz lietojami filtra uzgaļi, 200 µl†	26	50	74	98
Vienreiz lietojami filtra uzgaļi, 1500 µl†	72	136	200	264
Paraugu sagatavošanas kasetnes§	21	42	63	84
8 stieņu pārsegi¶	3	6	9	12

\* Ja katrā sērijā izmantosit mazāk nekā 24 paraugus, tiks samazināts katrā testā nepieciešamo vienreizējas lietošanas filtra uzgaļu skaits.

† Katrā filtra uzgaļu statīvā ir pieejami 32 filtra uzgaļi.

‡ Nepieciešamajā filtra uzgaļu skaitā ir iekļauti filtra uzgaļi 1 inventāra skenēšanai katrā reagenta kasetnē.

§ Katrā ierīces blokā ir 28 paraugu sagatavošanas kasetnes.

¶ Katrā ierīces blokā ir divpadsmit 8 stieņu pārsegi.

**Piezīme.** Filtra uzgaļu skaits var atšķirties no skārienekrānā parādītā skaita atkarībā no iestatījumiem. Ieteicams ievietot maksimālo iespējamo uzgaļu skaitu.

## Eluāta tilpums

Eluāta tilpums jāizvēlas skārienekrānā. Atkarībā no parauga veida un DNS satura galīgais eluāta tilpums var būt par līdz pat 15 µl mazāks nekā atlasītais tilpums. Tā kā eluāta tilpums var atšķirties, ieteicams pārbaudīt faktisko eluāta tilpumu, kad izmantojat automatizētu testu komplekta sistēmu, kas nepārbauda eluāta tilpumu pirms pārneses. Eluēšana ar mazāku tilpumu palielina galīgo DNS koncentrāciju, tomēr nedaudz samazina ieguves apjomu. Ieteicams izmantot tādu eluāta tilpumu, kas ir piemērots paredzētajam lejupvērstajam lietojumam.

## Parauga materiāla sagatavošana

Strādājot ar ķīmiskām vielām, vienmēr valkājiet piemērotu laboratorijas halātu, vienreizējas lietošanas cimdus un aizsargbrilles. Lai saņemtu papildinformāciju, iepazīstieties ar attiecīgajām drošības datu lapām (Safety Data Sheets, SDS), kas ir pieejamas pie produkta piegādātāja.

### Svarīga informācija pirms darba sākšanas

- QIASymphony magnētiskās daļiņas vienlaicīgi attīra RNS un DNS, ja tās atrodamas paraugā. Lai līdz minimumam samazinātu RNS saturu paraugā, pievienojiet paraugam RNāzi A darbībā, kas norādīta atbilstošajā priekšapstrādes protokolā.

### Pirms darba sākšanas jāveic šādas darbības

- Pārbaudiet, vai buferšķīdumā ATL ir baltas nogulsnes. Ja nepieciešams, inkubējiet 30 minūtes 37 °C temperatūrā un periodiski sakratiet, lai izšķīdinātu nogulsnes.
- Ierīcē ThermoMixer® vai maisītājā–inkubatorā iestatiet atbilstošajai priekšapstrādei nepieciešamo temperatūru.\*

### Audi

DNS attīrīšanai var izmantot gan svaigus, gan sasaldētus audus. Iegūtais DNS apjoms un kvalitāte ir atkarīga no audu veida, avota un glabāšanas apstākļiem. Svaigus audus pirms apstrādes var sagriezt nelielos gabaliņos un glabāt –20 °C vai –80 °C temperatūrā. Vispārīgi ir ieteicams izmantot augsta satura protokolu, kas nodrošinās palielinātu DNS ieguves apjomu. Zema satura protokols kopā ar 50 µl eluāta tilpumu ir ieteicams tikai gadījumos, kad lejupvērstai analīzei nepieciešama augsta DNS koncentrācija. Ja informācija par paredzamo ieguves apjomu nav pieejama, ieteicams sākt darbu ar 25 mg parauga materiāla, izmantojot augsta satura protokolu, kā arī eluāta tilpumu 200 µl. Atkarībā no ieguves apjoma parauga lielumu turpmākajos preparātos var palielināt un eluāta tilpumu — samazināt. Ņemiet vērā, ka pārslogotas sagataves kopā ar nelielu eluāta tilpumu var izraisīt magnētisku daļiņu pārnesei eluātā, kā arī negatīvi ietekmēt DNS tīrību un lejupvērsto analīzi.

### Audu priekšapstrādes protokols

1. Pārnēsiet audu paraugu 2 ml mikrocentrifūgas stobriņā (nav iekļauts komplektācijā).
2. Pievienojiet 220 µl buferšķīduma ATL.

\* Pārliecinieties, vai instrumenti ir pārbaudīti, apkopti un kalibrēti saskaņā ar ražotāja ieteikumiem.

3. Pievienojiet 20 µl proteināzes K un samaisiet, viegli piesitot pie stobriņa.  
Piezīme. Izmantojiet proteīnāzi K no QIASymphony DSP DNS Mini Kit enzīmu statīva.
4. Ievietojiet stobriņu ierīcē ThermoMixer vai maisītājā–inkubatorā un inkubējiet 56 °C temperatūrā, maisot ar ātrumu 900 apgriezieni minūtē, līdz audi ir pilnībā lizēti.  
Piezīme. Lizēšanas laiks ir atkarīgs no apstrādājamo audu veida. Vairākumā gadījumu lizēšana tiek pabeigta 3 stundu laikā. Ja lizēšana nav pabeigta pēc 3 stundām, par ko liecina nešķīstoša materiāla vai izteikti viskoza lizāta klātbūtne, lizēšanas laiku var palielināt vai nešķīstošu materiālu var noņemt, izmantojot centrifugēšanu, kā aprakstīts 6. darbībā. Lizēšanu var veikt visu nakti — tas neietekmē preparēšanu.
5. Lai līdz minimumam samazinātu RNS saturu paraugā, pievienojiet 4 µl RNāzes A (100 mg/ml) un inkubējiet 2 minūtes istabas temperatūrā (15–25 °C); pēc tam veiciet 6. darbību.
6. Homogenizējiet paraugu, vairākas reizes pipetējot uz augšu un uz leju.  
Piezīme. Ja joprojām konstatējat nešķīstoša materiāla klātbūtni, centrifugējiet režīmā 3000 x g 1 minūti.
7. Uzmanīgi pārnēsiet 220 µl supernatanta paraugu stobriņos, kas ir saderīgi ar QIASymphony SP paraugu turētāju.  
Pilnu sarakstu ar saderīgiem paraugu stobriņiem skatiet vietnē [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Ieteicams izmantot 2 ml stobriņus (piem., Sarstedt® kat. nr. 72.693 vai 72.608).

## FFPE audi

Standarta procedūras fiksācijai formalīnā un iegulšanai parafīnā vienmēr rada ievērojamu nukleīnskābju sadrumstalošanos. Lai ierobežotu DNS sadrumstalošanos, veiciet tālāk norādītās darbības.

- Pēc iespējas drīzāk pēc ķirurģiskas noņemšanas nofiksējiet paraugus 4–10% formalīna šķīdumā.
- Fiksācijas laikam jābūt 14–24 stundas (ilgāks fiksācijas laiks izraisa izteiktāku DNS sadrumstalošanos, kas savukārt samazina lejupvērstu testu efektivitāti).
- Pirms iegulšanas rūpīgi dehidrējiet paraugus (lieks formalīns var ierobežot proteīnāzes K noārdīšanu).

DNS attīrīšanai paredzētajam sākuma materiālam jābūt svaigi sagrieztām FFPE audu daļām. Vienā preparātā var apstrādāt līdz pat 4 daļām, kur katras daļas biezums nepārsniedz 10 µm, vai līdz 8 daļām, kur katras daļas biezums nepārsniedz 5 µm un virsmas laukums nepārsniedz 250 mm<sup>2</sup>. Ja informācija par sākotnējo materiālu nav pieejama, ieteicams sākt darbu ar ne vairāk kā 3 daļām vienā preparātā. Atkarībā no DNS ieguves apjoma un tīrības turpmākos preparātos var izmantot līdz pat 8 daļām.

Piezīme. FFPE audu protokoli ir īpaši izstrādāti, lai kopīgi attīrītu tikai mazu RNS daudzumu. Tādējādi fotometrijas mērījuma vērtība būs mazāka, salīdzinot ar vērtībām, ko nodrošina manuālais QIAamp® DSP DNS FFPE audu komplekts.

### FFPE audu priekšapstrādes protokols

#### 1. metode: deparafinizācija, izmantojot deparafinizācijas šķīdumu

1. Ar skalpeli noņemiet lieko parafīnu no paraugu bloka.
2. Sagrieziet līdz 4 daļām 10 µm biežumā vai līdz 8 daļām 5 µm biežumā.  
Piezīme. Ja parauga virsma ir nonākusi saskarē ar gaisu, utilizējiet pirmās 2–3 daļas.
3. Nekavējoties ievietojiet daļas 2 ml Sarstedt stobriņā (nav iekļauts komplektācijā; kat. nr. 72.693 vai 72.608), kas ir saderīgs ar QIASymphony SP stobriņu turētāju.
4. Daļām pievienojiet 200 µl buferšķīduma ATL.
5. Pievienojiet 20 µl proteīnāzes K.  
Piezīme. Izmantojiet proteīnāzi K no QIASymphony DSP DNA Mini Kit enzīmu statīva.
6. Pievienojiet 160 µl vai 320 µl deparafinizācijas šķīduma (skatiet tālāk sniegto tabulu) un sajauciet saskalīnot.

Daļu biežums	Daļu skaits	Deparafinizācijas šķīduma tilpums
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Ievietojiet stobriņu ierīcē ThermoMixer vai maisītājā–inkubatorā un inkubējiet 56 °C temperatūrā 1 stundu, maisot ar ātrumu 1000 apgriezieni minūtē, līdz audi ir pilnībā lizēti.  
Piezīme. Lizēšanas laiks ir atkarīgs no apstrādājamo audu veida. Vairākumā gadījumu lizēšana tiek pabeigta 1 stundas laikā. Ja lizēšana nav pabeigta pēc 1 stundas, par ko liecina nešķīstoša materiāla klātbūtne, lizēšanas laiku var palielināt vai nešķīstošu materiālu var ekstrudēt, izmantojot centrifugēšanu, kā aprakstīts 10. darbībā. Lizēšanu var veikt visu nakti — tas neietekmē preparēšanu.

8. Inkubējiet 90 °C temperatūrā 1 stundu.  
Piezīme. Inkubācija 90 °C temperatūrā buferšķīdumā ATL daļēji atceļ nukleīnskābju formaldehīda pārveidošanu. Ilgāks inkubācijas laiks vai augstāka inkubācijas temperatūra var izraisīt izteiktāku DNS sadrumstalošanos. Ja izmantojat tikai vienu sildīšanas bloku, pēc inkubācijas 56 °C temperatūrā atstājiet paraugu istabas temperatūrā, līdz siltuma blokā tiek sasniegta 90 °C temperatūra.
9. Lai līdz minimumam samazinātu RNS saturu paraugā, zemākajā fāzē pievienojiet 2 µl RNāzes A (100 mg/ml) un inkubējiet 2 minūtes istabas temperatūrā; pēc tam veiciet 10. darbību. Pirms RNāzes A pievienošanas ļaujiet paraugam atdzist līdz istabas temperatūrai.
10. Centrifugējiet maksimālajā ātrumā 1 minūti istabas temperatūrā.
11. Uzmanīgi pārvietojiet stobriņus (ar abām fāzēm) uz QIASymphony SP paraugu turētāju.

## 2. metode: deparafinizācija, izmantojot ksilolu

1. Ar skalpeli noņemiet lieko parafīnu no paraugu bloka.
2. Sagrieziet līdz 4 daļām 10 µm biezumā vai līdz 8 daļām 5 µm biezumā.  
Piezīme. Ja parauga virsma ir nonākusi saskarē ar gaisu, utilizējiet pirmās 2–3 daļas.
3. Nekavējoties ievietojiet daļas 1,5 vai 2 ml mikrocentrifūgas stobriņā (nav iekļauts komplektācijā) un pievienojiet paraugam 1 ml ksilola. Aizveriet vāku un enerģiski saskaliniet 10 sekundes.
4. Centrifugējiet maksimālajā ātrumā 2 minūtes istabas temperatūrā.
5. Noņemiet supernatantu, to pipetējot. Nenoņemiet granulas.
6. Granulai pievienojiet 1 ml etanola (96–100%) un sajauciet saskalinot.  
Piezīme. Etanols izvilks lieko ksilolu no parauga.
7. Centrifugējiet maksimālajā ātrumā 2 minūtes istabas temperatūrā.
8. Noņemiet supernatantu, to pipetējot. Nenoņemiet granulas.  
Piezīme. Uzmanīgi noņemiet lieko etanolu, izmantojot smalku pipetes uzgali.
9. Atveriet stobriņu un inkubējiet istabas temperatūrā (15–25 °C) 10 minūtes vai līdz viss liekais etanols ir iztvaikojis.  
Piezīme. Inkubāciju var veikt temperatūrā līdz 37 °C.
10. Atkārtoti iemērciet granulu 220 µl buferšķīduma ATL.
11. Pievienojiet 20 µl proteīnāzes K un sajauciet saskalinot.  
Piezīme. Izmantojiet proteīnāzi K no QIASymphony DSP DNA Mini Kit enzīmu statīva.



12. Inkubējiet 56 °C temperatūrā 1 stundu (vai līdz paraugs ir pilnībā lizēts).

Piezīme. Lizēšanas laiks ir atkarīgs no apstrādājamo audu veida. Vairākumā gadījumu lizēšana tiek pabeigta 1 stundas laikā. Ja lizēšana nav pabeigta pēc 1 stundas, par ko liecina nešķīstoša materiāla klātbūtne, lizēšanas laiku var palielināt vai nešķīstošu materiālu var noņemt, izmantojot centrifugēšanu, kā aprakstīts 16. darbībā. Lizēšanu var veikt visu nakti — tas neietekmē preparēšanu.

13. Inkubējiet 90 °C temperatūrā 1 stundu.

Piezīme. Inkubācija 90 °C temperatūrā buferšķīdumā ATL daļēji atceļ nukleīnskābju formaldehīda pārveidošanu. Ilgāks inkubācijas laiks vai augstāka inkubācijas temperatūra var izraisīt izteiktāku DNS sadrumstalošanos. Ja izmantojat tikai vienu sildīšanas bloku, pēc inkubācijas 56 °C temperatūrā atstājiet paraugu istabas temperatūrā, līdz siltuma blokā tiek sasniegta 90 °C temperatūra.

14. Neilgi centrifugējiet paraugu, lai noņemtu vāka iekšpusē esošos pilienus.

15. Lai līdz minimumam samazinātu RNS saturu paraugā, pievienojiet 2 µl RNāzes A (100 mg/ml) un inkubējiet 2 minūtes istabas temperatūrā; pēc tam veiciet 16. darbību. Pirms RNāzes A pievienošanas ļaujiet paraugam atdzist līdz istabas temperatūrai.

16. Uzmanīgi pārnesiet 220 µl lizāta paraugu stobriņos, kas ir saderīgi ar QIASymphony SP paraugu turētāju.

Piezīme. Ja lizāts satur nenoārdītu materiālu, centrifugējiet maksimālajā ātrumā 2 minūtes istabas temperatūrā un tikai pēc tam pārnesiet supernatantu paraugu stobriņos. Pilnu sarakstu ar saderīgiem paraugu stobriņiem skatiet vietnē [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Ieteicams izmantot 2 ml stobriņus (piem., Sarstedt, kat. nr. 72.693 vai 72.608).

## Pārskatījumu vēsture

Dokumenta pārskatījumu vēsture	
R3 12/2017	QIASymphony programmatūras versijas 5.0 atjauninājums

Jaunāko informāciju par licencēšanu, kā arī uz konkrētiem izstrādājumiem attiecināmas atrunas skatiet attiecīgā QIAGEN® komplekta rokasgrāmatā vai lietotāja instrukcijās. QIAGEN komplektu lietotāja rokasgrāmatas un lietotāja instrukcijas ir pieejamas [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), kā arī tās var pieprasīt QIAGEN tehniskā atbalsta centros vai pie vietējiem preču izplatītājiem.

Preču zīmes: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Nedrīkst uzskatīt, ka šajā dokumentā minētos reģistrētos nosaukumus, preču zīmes u.c. neaizsargā likums, pat ja pretējais nav īpaši norādīts.  
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, visas tiesības aizsargātas.

---

Pasūtīšana: [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Tehniskais atbalsts: [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Tīmekļa vietne: [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)