

Februar 2017

Handbuch für das QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit



Version 1



In-vitro-Diagnostikum



60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Straße 1, 40724 Hilden,
DEUTSCHLAND



1062689DE



Inhalt

Verwendungszweck	5
Zusammenfassung und Erklärung	5
Verfahrensprinzip	6
Mitgelieferte Materialien	8
Kit-Inhalt	8
Zusätzlich benötigtes Material	9
Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen	10
Lagerung und Handhabung der Reagenzien	11
Lagerung und Handhabung der Proben	12
Verfahren	13
Vorbereitung der Puffer	14
Ausgangsmaterial	15
Handhabung zur Vermeidung einer Kreuzkontamination	16
Zentrifugieren	17
Zentrifugieren von QIAamp MinElute-Säulen in einer Mikrozentrifuge	17
Elution gereinigter DNA	18
Protokoll: Extraktion genomischer DNA aus FFPE-Gewebeschnitten	20
Qualitätskontrolle	24
Anwendungseinschränkungen	24
Leistungsmerkmale	25
Symbole	25
Kontakt	26
Bestellinformationen	27

Verwendungszweck

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit ist ein System zur Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten (Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) biologischen Proben auf der Grundlage der Silicamembrantechnologie (QIAamp-Technologie).

Das Produkt ist für die Verwendung durch Fachpersonen wie etwa Labortechnikern und Ärzte bestimmt, die in der Anwendung molekularbiologischer Techniken für die In-vitro-Diagnostik (IVD) geschult sind. Es ist für die manuelle Probenvorbereitung bestimmt und liefert keine qualitativen oder quantitativen Testergebnisse.

Zusammenfassung und Erklärung

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit wird für die Reinigung von DNA aus FFPE-Gewebeschnitten verwendet. Es dient der Reinigung genomischer und mitochondrialer DNA aus kleinen Probenvolumen bzw. -größen mithilfe der bewährten QIAamp DNA Micro-Technologie. Das Kit kombiniert die selektiven Bindungseigenschaften einer silicabasierten Membran mit flexiblen Elutionsvolumen.

Die Lysebedingungen ermöglichen eine effiziente Reinigung genomischer DNA aus FFPE-Gewebeschnitten ohne Inkubation über Nacht. Durch die Inkubation bei erhöhter Temperatur nach dem Proteinase K-Verdau werden die Formalinquerverbindungen in der freigesetzten DNA teilweise entfernt, wodurch sich die Ausbeute und das Verhalten der DNA in späteren Assays unter Umständen verbessern. Es ist zu beachten, dass aus FFPE-Proben in der Regel DNA mit einem niedrigeren Molekulargewicht isoliert wird als aus frischen oder gefrorenen Proben. Der Grad der Fragmentierung hängt von der Art und vom Alter der Probe und der Fixierungsbedingungen ab.

Nach der Probenlyse können mit dem einfachen QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-Verfahren mehrere Proben gleichzeitig verarbeitet werden.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die im Handbuch beschriebenen Leistungsstudien von QIAGEN abgedeckt ist, die Leistungscharakteristik des Systems selbst zu validieren.

Verfahrensprinzip

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-Verfahren besteht aus sechs Schritten (Abbildung 1):

- Entfernung von Paraffin: Das Paraffin wird in Xylen gelöst und entfernt
- Lyse: Die Probe wird bei 56 °C unter denaturierenden Bedingungen mit Proteinase K lysiert
- Erwärmung: Die Inkubation bei 90 °C entfernt die Formalinquerverbindungen
- Bindung: DNA bindet an die Membran und Verunreinigungen laufen durch
- Waschen: Restliche Verunreinigungen werden weggespült
- Eluieren: Aus der Membran wird reine konzentrierte DNA eluiert

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure

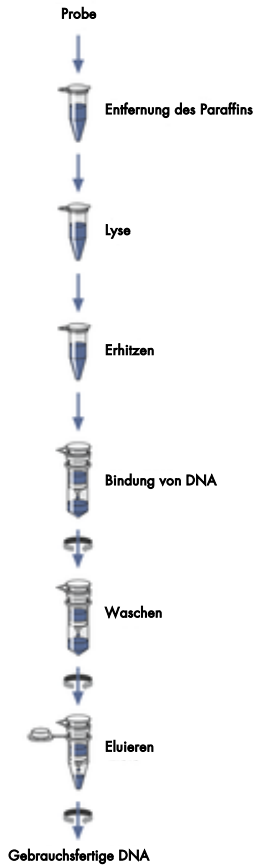


Abbildung 1. Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-Verfahren

Mitgelieferte Materialien

Kit-Inhalt

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Katalog-Nr.			60404
Anzahl der Reaktionen			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns (QIAamp MinElute-Säulen) mit Wash Tubes (Waschröhrchen)	COL	50
WT	Wash Tubes (Waschröhrchen) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (Elutionsröhrchen) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Lyseröhrchen) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Gewebe Lysepuffer)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer* (Lysepuffer)	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (Waschpuffer) (Konzentrat)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2-	Wash Buffer 2† (Waschpuffer) (Konzentrat)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer† (Elutionspuffer)	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K	PROTK	1,25 ml
-	Gebrauchsanleitung (Handbuch)	H B	1

* Enthält ein Guanidinsalz. Nicht mit Desinfektionsmitteln in Kontakt bringen, die Chlorbleiche (Natriumhypochlorit, NaOCl) enthalten. Siehe Seite 10 bzgl. der Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen.

† Enthält Natriumazid als Konservierungsmittel.

Zusätzlich benötigtes Material

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen, die vom Hersteller des jeweiligen Produkts bereitgestellt werden.

Reagenzien

- Xylen
- Ethanol (96–100 %) *

Verbrauchsmaterialien

- Wenn entschieden wird, nicht die im Kit enthaltenen Röhrchen zu verwenden, empfehlen wir 1,5-ml- oder 2-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (für Lyseschritte) und 1,5-ml-Mikrozentrifugenröhrchen (für Elutionsschritte) (erhältlich von Eppendorf® [Safe-Lock: Kat.-Nr. 022363204, USA; Kat.-Nr. 0030 120.086, Europa] oder Sarstedt [Kat.-Nr. 72.690]). Wir empfehlen DNase/RNase-freie konische Röhrchen mit Sicherheitsdeckeln.
- Pipetten und Pipettenspitzen (zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen empfehlen wir dringend Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern)

Geräte

- Thermomixer[†], beheizter Orbitalinkubator, Wärmeblock oder Wasserbad zur Inkubation bei 56 °C, 70 °C und 90 °C
- Mikrozentrifuge[†] mit Rotor für 2-ml-Röhrchen
- Vortexmischer

* Es darf kein denaturierter Alkohol verwendet werden, der andere Stoffe, wie z. B. Methanol oder Methyläthylketon, enthält.

[†] Um eine ordnungsgemäße Probenverarbeitung mit den QIAamp DSP DNA FFPE-Verfahren sicherzustellen, empfehlen wir dringend, die Geräte nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers zu kalibrieren.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum

Tragen Sie beim Umgang mit Chemikalien stets Laborkittel, Einweghandschuhe und Schutzbrille. Weitere Informationen können Sie den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern entnehmen. Diese sind im praktischen, kompakten PDF-Format online unter www.qiagen.com/safety verfügbar; hier können Sie die Sicherheitsdatenblätter zu allen Kits und Kit-Komponenten von QIAGEN® einsehen und ausdrucken.



VORSICHT: Es dürfen KEINE Bleichlösungen oder saure Lösungen direkt zum Probenvorbereitungsabfall zugegeben werden.

Puffer AL und Puffer AW1 enthalten Guanidinhydrochlorid, das in Kombination mit Bleiche hoch reaktive Verbindungen bilden kann.

Wenn eine Flüssigkeit mit diesen Puffern verschüttet wird, reinigen Sie mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser. Wenn die verschüttete Flüssigkeit potenziell infektiöse Erreger enthält, reinigen Sie den betroffenen Bereich zuerst mit einem Laborreinigungsmittel und Wasser und dann mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorit.

Die folgenden Gefahren- und Sicherheitssätze gelten für die Komponenten des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits.

AL-Puffer



Enthält: Guanidinhydrochlorid; Maleinsäure. Achtung! Kann bei Verschlucken oder Einatmen gesundheitsschädlich sein. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

ATL-Puffer



Achtung! Verursacht leichte Hautreizungen. Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Puffer AW1



Enthält: Guanidinhydrochlorid. Achtung! Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenreizung. Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. Inhalt/Behälter einer genehmigten Deponie zuführen. Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen. Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen.

Proteinase K



Enthält: Proteinase K. Gefahr! Verursacht leichte Hautreizungen. Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen. Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden. Inhalt/Behälter einer genehmigten Deponie zuführen. Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen. BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, in der sie leicht atmet. Atemschutz tragen.

Lagerung und Handhabung der Reagenzien

QIAamp MinElute-Säulen sollten nach der Lieferung bei 2–8 °C aufbewahrt werden und sind bis zu dem auf der Kitschachtel angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendbar.

Alle Puffer können bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufbewahrt werden und sind bis zum Haltbarkeitsdatum des Kits stabil. Die rekonstituierten Puffer AW1 und AW2 können bei Raumtemperatur (15–25 °C) bis zu ein Jahr lang, höchstens jedoch bis zu dem auf dem Kit angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.

Das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit enthält eine gebrauchsfertige Proteinase K-Lösung in einem speziell formulierten Aufbewahrungspuffer. Die Proteinase K ist bei Lagerung bei Raumtemperatur (15–25 °C) bis zum Haltbarkeitsdatum des Kits stabil.

Lagerung und Handhabung der Proben

Zur Begrenzung des Ausmaßes der DNA-Fragmentierung sollten Standardverfahren zur Formalinfixierung und Einbettung in Paraffin angewendet werden, insbesondere:

- Die Gewebeproben sollten nach der chirurgischen Entnahme so schnell wie möglich unter Befolgung des Laborprotokolls in Formalin fixiert werden (10%iges neutral gepuffertes Formalin ist generell akzeptabel).
- Die Fixierungsdauer sollte 14–24 Stunden betragen. Die Fixierungsdauer begrenzen, da eine längere Fixierung (z. B. > 24 Stunden) zu einer stärkeren DNA-Fragmentierung führen kann, was das Verhalten der DNA in späteren Assays beeinträchtigt.
- Die Proben sind vor dem Einbetten gründlich zu entwässern (Formalinrückstände können den Proteinase K-Verdau hemmen).

Die DNA wird in Puffer ATE eluiert und kann direkt in Amplifikationsreaktionen verwendet oder aufbewahrt werden (die Bedingungen sind von den Anforderungen des Benutzers abhängig). Es sind die Handbücher der jeweiligen Kits hinsichtlich der für bestimmte, im Anschluss durchgeführte QIAGEN-Anwendungen empfohlenen Lagerungsbedingungen zu beachten.

Verfahren

Wichtige Hinweise, die vor der Durchführung zu beachten sind

- Alle in dem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit enthaltenen Reagenzien sind ausschließlich für die Verwendung mit den anderen Reagenzien aus diesem QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit vorgesehen. Zur Gewährleistung einer optimalen Leistung dürfen die Reagenzien des Kits nicht ausgetauscht werden.
- Überprüfen Sie alle Kit-Komponenten auf Beschädigung, nachdem das Kit geliefert worden ist. Falls die Verpackungen oder die Pufferflaschen beschädigt sind, verständigen Sie den Technischen Service von QIAGEN oder Ihren Händler vor Ort. Für den Fall, dass Flüssigkeit ausgetreten ist oder verschüttet wurde, beachten Sie bitte den Abschnitt „Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen“, Seite 10). Verwenden Sie keine beschädigten Kit-Komponenten, da dies zu einer Beeinträchtigung der Leistung des Kits führen könnte.
- Verwenden Sie keine Kit-Komponenten von anderen Kit zusammen mit dem Kit, das Sie aktuell verwenden, es sei denn, die Chargennummern sind identisch.
- Vermeiden Sie eine Verunreinigung der Kitreagenzien mit Mikroorganismen.
- Das Kit sollte nur von Personen verwendet werden, die in der Laborpraxis für In-vitro-Diagnostik geschult sind.
- Tragen Sie stets Latex- oder Vinylhandschuhe, wenn Sie mit Reagenzien oder Proben arbeiten, um eine Kontamination über die Hautoberfläche oder durch staubige Laborgeräte zu vermeiden. Hände und Staubpartikel können Bakterien und Schimmelpilze tragen und sind häufige Kontaminationsursachen. Wechseln Sie die Einmal-Handschuhe häufig und halten Sie Röhrchen verschlossen.
- Unbenutzte Puffer, Filtrate und Probenreste sollten nach den vor Ort üblichen Verfahren entsorgt werden.

- Wenn Sie eigene Kunststoffartikel verwenden, wird empfohlen, während der gesamten Reinigung DNase/RNase-freie, bindungsarme, konische 1,5- bis 2-ml-Einwegröhrchen aus Polypropylen mit gesichertem Deckel zu verwenden.
- Alle Zentrifugationsschritte sind bei Raumtemperatur (15–25 °C) durchzuführen.
- Alle Puffer sollten bei Raumtemperatur (15–25 °C) aufbewahrt und vor dem Gebrauch gut gemischt werden.
- Stellen Sie einen Thermomixer oder einen beheizten Orbitalinkubator für den Gebrauch in Schritt 11 auf 56 °C ein. Wenn kein Thermomixer oder beheizter Orbitalinkubator verfügbar ist, können Sie stattdessen einen Heizblock oder ein Wasserbad verwenden.
- Wenn der AL-Puffer oder der ATL-Puffer einen Niederschlag enthalten, kann dieser durch Erwärmen auf 70 °C unter leichtem Schütteln gelöst werden.
- Achten Sie darauf, dass der Puffer AW1 und der Puffer AW2 nach den unten beschriebenen Anleitungen vorbereitet werden.
- Bei QIAGEN wird jede einzelne Kit-Charge im Rahmen der Qualitätskontrolle zur Freigabe einem Funktionstest unterzogen. Mischen Sie daher keine Reagenzien aus verschiedenen Kit-Chargen und kombinieren Sie keine einzelnen Reagenzien aus verschiedenen Reagenzienchargen.

Vorbereitung der Puffer

Vorbereitung des ATL-Puffers

- Überprüfen Sie, bevor Sie mit dem Verfahren beginnen, ob sich in dem ATL-Puffer ein Niederschlag gebildet hat. Lösen Sie ggf. den Niederschlag durch Erwärmen auf 70 °C unter leichtem Schütteln auf.

Vorbereitung des AL-Puffers

- Überprüfen Sie, bevor Sie mit dem Verfahren beginnen, ob sich in dem AL-Puffer ein Niederschlag gebildet hat. Lösen Sie ggf. den Niederschlag durch Erwärmen auf 70 °C unter leichtem Schütteln auf.

Vorbereitung des Puffers AW1

- Geben Sie 25 ml Ethanol (96–100 %) in die Flasche mit 19 ml konzentriertem Puffer AW1. Zeichnen Sie das Kontrollkästchen auf dem Flaschenetikett ab, damit ersichtlich ist, dass Ethanol zugegeben wurde. Der rekonstituierte Puffer AW1 kann bei Raumtemperatur (15–25 °C) bis zu ein Jahr lang, höchstens jedoch bis zu dem auf dem Kit angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Wir empfehlen, das Datum der Rekonstitution auf dem Etikett des Puffers zu vermerken.

Hinweis: Mischen Sie, bevor Sie mit dem Verfahren beginnen, den rekonstituierten Puffer AW1, indem Sie ihn schütteln.

Vorbereitung des Puffers AW2

- Geben Sie 30 ml Ethanol (96–100 %) in die Flasche mit 13 ml konzentriertem Puffer AW2. Zeichnen Sie das Kontrollkästchen auf dem Flaschenetikett ab, damit ersichtlich ist, dass Ethanol zugegeben wurde. Der rekonstituierte Puffer AW2 kann bei Raumtemperatur (15–25 °C) bis zu ein Jahr lang, höchstens jedoch bis zu dem auf dem Kit angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Wir empfehlen, das Datum der Rekonstitution auf dem Etikett des Puffers zu vermerken.

Hinweis: Mischen Sie, bevor Sie mit dem Verfahren beginnen, den rekonstituierten Puffer AW2, indem Sie ihn schütteln.

Ausgangsmaterial

Das Ausgangsmaterial für die DNA-Reinigung sind FFPE-Gewebeschnitte (idealerweise frisch hergestellte Schnitte). Es können mehrere Schnitte in einer Präparation kombiniert werden. Wenn Ihnen keine Informationen über die Art Ihres Ausgangsmaterials vorliegen, empfehlen wir, mit höchstens drei Schnitten pro Präparation zu beginnen.

Der Benutzer sollte die Anzahl der Schnitte, die Schnittdicke und die Schnittfläche hinsichtlich der im jeweiligen Labor durchgeführten Verfahren optimieren. Wird das Kit in Verbindung mit einer späteren QIAGEN-Anwendung verwendet, sind die Anweisungen in dem entsprechenden Handbuch zu beachten.

Handhabung zur Vermeidung einer Kreuzkontamination

Wegen der Sensitivität der Nukleinsäure-Amplifikationstechnik sind bei der Handhabung der QIAamp MinElute-Säulen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen nötig, um Kreuzkontaminationen zwischen den Proben zu vermeiden:

- Geben Sie nicht zu viel Gewebe in die Rörchen.
- Wechseln Sie die Skalpelle zwischen den Proben, wenn Sie Gewebe abschaben.
- Gehen Sie beim Auftragen der Probe bzw. Lösung auf die QIAamp MinElute-Säule behutsam vor. Achten Sie beim Pipettieren der Probe in die QIAamp MinElute-Säule darauf, den Rand der Säule nicht zu benetzen.
- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Wir empfehlen, Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern zu verwenden.
- Verwenden Sie bei den Probenwaschschritten stets neue Waschrörchen.
- Vergewissern Sie sich vor dem Vortexen und Zentrifugieren, dass die Deckel der Rörchen geschlossen sind.
- Vergewissern Sie sich vor dem Zentrifugieren, dass die QIAamp MinElute-Säule ganz geschlossen ist.
- Zentrifugieren Sie die Mikrozentrifugenrörchen nach jedem kurzen Vortexen und nach jeder Inkubation bei 90 °C kurz, um Tropfen von der Unterseite der Deckel zu entfernen.
- Öffnen Sie stets nur eine QIAamp MinElute-Säule, und vermeiden Sie Aerosolbildung.
- Verwenden Sie für jede Probe ein frisches Skalpell.

- Wechseln Sie zwischen den verschiedenen Pipettierschritten stets die Pipettenspitzen. Zur Minimierung von Kreuzkontamination empfehlen wir, Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern zu verwenden und auf die Verwendung von Multistep-Pipetten möglichst zu verzichten.
- Tragen Sie stets Einweghandschuhe und überprüfen Sie regelmäßig, ob diese mit Probenmaterial verschmutzt sind. Entsorgen Sie die Handschuhe, falls sie kontaminiert worden sind.
- Öffnen Sie immer nur ein Gefäß.

Zentrifugieren

QIAamp MinElute-Säulen passen in die meisten 1,5- bis 2-ml-Mikrozentrifugen-Standardröhrchen. Zusätzliche 2-ml-Waschröhrchen sind separat erhältlich (QIAGEN, Kat.-Nr. 19201). QIAamp MinElute-Säulen werden bei ungefähr 6000 x g zentrifugiert, um Zentrifugenlärm zu reduzieren. Eine Zentrifugation bei voller Drehzahl führt nicht zu einer besseren DNA-Ausbeute. Allerdings ist bei zwei Schritten des Verfahrens tatsächlich eine Zentrifugation der QIAamp MinElute-Säulen bei voller Drehzahl erforderlich: beim Zentrifugieren zum Trocknen nach dem Waschen der Membranen und bei der Elution. Eine Zentrifugation bei voller Drehzahl ist auch erforderlich, um die Probe nach der Xylenbehandlung und dem Ethanolwaschschritt auf dem Boden des Gefäßes zu sammeln.

Alle Zentrifugationsschritte sollten bei Raumtemperatur (15-25 °C) durchgeführt werden. Eine niedrige Zentrifugationstemperatur kann zu einem suboptimalen Extraktionsergebnis führen.

Zentrifugieren von QIAamp MinElute-Säulen in einer Mikrozentrifuge

- Verschließen Sie die QIAamp MinElute-Säulen stets, bevor Sie sie in die Mikrozentrifuge setzen.
- Achten Sie darauf, dass Sie die Membran der QIAamp MinElute-Säule nicht mit der Pipettenspitze berühren.

- Das Filtrat könnte gesundheitsschädliche Stoffe enthalten und muss daher entsprechend entsorgt werden.
- Für eine effiziente Parallelverarbeitung vieler Proben empfehlen wir, ein Gestell mit Waschröhrchen bereit zu stellen, in welche die QIAamp MinElute-Säulen nach dem Zentrifugieren überführt werden können. Benutzte Waschröhrchen, die Filtrat enthalten, können entsorgt werden, und neue Waschröhrchen mit QIAamp MinElute-Säulen können dann direkt in die Mikrozentrifuge gestellt werden.
- Achten Sie darauf, dass während des gesamten Vorgangs eine lückenlose Rückverfolgbarkeit der Proben gewährleistet ist.

Elution gereinigter DNA

Wenn bei anschließenden Anwendungen kleine Ausgangsvolumen benötigt werden (wie z. B. bei manchen PCR-Assays), lässt sich die Assayempfindlichkeit durch Verwendung eines höher konzentrierten Eluats unter Umständen verbessern. Andererseits könnte sich dadurch aber auch die Konzentration möglicher Hemmstoffe erhöhen.

Eine Erhöhung des Elutionsvolumens führt zur Verringerung der DNA-Konzentration in dem Eluat.

Das Volumen des gewonnenen Eluats kann ungefähr 5 µl unter dem auf die QIAamp MinElute-Säule aufgetragenen Volumen des ATE-Puffers liegen. Ein Elutionsvolumen von 20 µl ergibt beispielsweise ≥ 15 µl Eluat. Wie viel Eluat gewonnen wird, hängt von der Art der Probe ab.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, das Elutionsvolumen für alle im Labor durchgeführten Verfahren zu optimieren. Es sind die Handbücher der jeweiligen Kits hinsichtlich der für bestimmte, im Anschluss durchgeführte QIAGEN-Anwendungen erforderlichen Elutionsvolumen zu beachten.

Die Ausbeute lässt sich unter Umständen erhöhen, indem die Säule vor dem Zentrifugieren beispielsweise 5 Minuten bei Raumtemperatur mit ATE-Puffer inkubiert wird. Eluierte DNA kann in den 1,5-ml-Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten) gesammelt werden. Die Bedingungen zur Aufbewahrung der eluierten DNA sind von den vom Anwender festgelegten Anforderungen abhängig. Es sind die Handbücher der Kits hinsichtlich der für bestimmte, im Anschluss durchgeführte QIAGEN-Anwendungen empfohlenen Lagerungsbedingungen zu beachten.

Protokoll: Extraktion genomischer DNA aus FFPE-Gewebeschnitten

Verfahren

1. Schneiden Sie mit einem Skalpell überschüssiges Paraffin vom Probenblock ab.
2. Fertigen Sie unter Befolgung der Standardlaborpraxis Schnitte an (siehe „Ausgangsmaterial“, Seite 15). Der Benutzer sollte die Anzahl der Schnitte, die Schnittdicke und die Schnittfläche hinsichtlich der im jeweiligen Labor durchgeführten Verfahren optimieren. Achten Sie darauf, dass während des gesamten Vorgangs eine Rückverfolgbarkeit der Proben gewährleistet ist.
3. Schaben Sie mit einem sterilen Skalpell das Gewebe aus den Schnitten sofort in ein Lyseröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten). Achten Sie darauf, dass verfügbare Gewebe vollständig in das Röhrchen zu überführen. Geben Sie 1 ml Xylen zu der Probe, schließen Sie den Deckel und vortexen Sie das Röhrchen kräftig, bis sich das Paraffin gelöst hat (z. B. 10 s). Achten Sie darauf, dass das Röhrchen fest verschlossen ist, damit kein Xylen verspritzt wird, keine Kreuzkontamination zwischen Proben auftritt und kein Kontakt mit dem Xylen stattfindet.

Hinweis: Verwenden Sie für die Arbeit mit Xylen eine Abzugshaube oder eine andere geeignete Sicherheitsvorrichtung.

4. Zentrifugieren Sie bei voller Drehzahl ungefähr 2 Min. bei Raumtemperatur, um das Gewebe in das Pellet zu überführen. Wenn sich kein Gewebepellet bildet, wiederholen Sie diesen Schritt.

Hinweis: Eine niedrige Zentrifugationstemperatur kann zu einem suboptimalen Extraktionsergebnis führen.

5. Pipettieren Sie den Überstand ab und entsorgen Sie ihn. Bewahren Sie das Pellet. Der Überstand enthält Xylen. Er ist daher als gesundheitsschädlicher Abfall zu betrachten und nach den maßgeblichen, vor Ort geltenden Bestimmungen zu entsorgen.

6. Geben Sie 1 ml Ethanol (96–100 %) zu dem Gewebepellet und mischen Sie gründlich auf dem Vortex.

Weil das Ethanol Xylenreste aus der Probe extrahiert, sollte es entsprechend entsorgt werden.

7. Zentrifugieren Sie bei voller Drehzahl ungefähr 2 Min. bei Raumtemperatur.

Pipettieren Sie den Überstand ab. Lassen Sie das Pellet intakt.

Entfernen Sie etwaige Ethanolreste vorsichtig mit einer feinen Pipettenspitze. Öffnen Sie das Röhrchen und inkubieren Sie es bei 15–40 °C, bis alle Ethanolrückstände verdunstet sind. Die Entfernung aller Ethanolrückstände ist für den Erfolg der Extraktion entscheidend.

Hinweis: Eine niedrigere Inkubationstemperatur verlangsamt den Verdunstungsvorgang, wohingegen das Pellet bei einer höheren Temperatur zu stark austrocknet und anschließend schwer wieder in Lösung gebracht werden kann.

8. Resuspendieren Sie das Pellet in 180 µl ATL-Puffer. Geben Sie 20 µl Proteinase K dazu und mischen Sie auf dem Vortex.

Hinweis: Das Pellet muss in dem ATL-Puffer gut resuspendiert werden, um eine maximale Ausbeute zu erzielen.

9. Inkubieren Sie ungefähr 1 Std. bei 56 °C ± 3 °C (bis die Probe vollständig lysiert ist).

10. Inkubieren Sie 1 Stunde ± 5 Min. bei 90 °C ± 5 °C.

Durch die Inkubation bei 90 °C in ATL-Puffer wird die Formaldehyd-Denaturierung der Nucleinsäuren teilweise rückgängig gemacht. Eine kürzere Inkubationsdauer oder niedrigere Inkubationstemperaturen können die Qualität und die Quantität der DNA beeinträchtigen. Wenn Sie nur einen Heizblock verwenden, lassen Sie die Probe nach der Inkubation bei 56 °C bei Raumtemperatur stehen, bis sich der Block auf 90 °C erwärmt hat.

11. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.

12. Geben Sie 200 µl AL-Puffer zu der Probe und mischen Sie gründlich auf dem Vortex. Geben Sie dann 200 µl Ethanol (96–100 %) hinzu und mischen Sie wiederum gründlich auf dem Vortex.
- Probe, AL-Puffer und Ethanol müssen unbedingt sofort und gründlich auf dem Vortex oder durch Pipettieren zu einer homogenen Lösung gemischt werden. AL-Puffer und Ethanol können bereits vorab gemischt und gemeinsam zugegeben werden, um Zeit zu sparen, wenn mehrere Proben parallel verarbeitet werden. Bei Zugabe von AL-Puffer und Ethanol kann sich ein weißer Niederschlag bilden. Dieser Niederschlag wirkt sich nicht störend auf das QIAamp-Verfahren aus. Verwenden Sie immer eine frische Mischung und entsorgen Sie sie direkt nach dem Gebrauch.
13. Zentrifugieren Sie das Röhrchen kurz, um Tropfen von der Unterseite des Deckels zu entfernen.
14. Überführen Sie das Lysat vollständig und vorsichtig auf die QIAamp MinElute-Säule (in einem 2-ml-Waschröhrchen), ohne den Rand zu benetzen, schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie das Röhrchen ≥ 1 Min. bei ungefähr 6000 x g. Geben Sie die QIAamp MinElute-Säule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten) und entsorgen Sie das Waschröhrchen mit dem Filtrat.
- Wenn das Lysat nach der Zentrifugation nicht vollständig durch die Membran gelaufen ist, wiederholen Sie die Zentrifugation bei einer höheren Geschwindigkeit, bis die QIAamp MinElute-Säule leer ist.
15. Öffnen Sie vorsichtig die QIAamp MinElute-Säule und geben Sie 500 µl rekonstituierten AW1-Puffer dazu, ohne dabei den Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie ≥ 1 Min. bei ungefähr 6000 x g. Geben Sie die QIAamp MinElute-Säule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen und entsorgen Sie das Waschröhrchen mit dem Filtrat.
16. Öffnen Sie vorsichtig die QIAamp MinElute-Säule und geben Sie 500 µl rekonstituierten AW2-Puffer dazu, ohne dabei den Rand zu benetzen. Schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie ≥ 1 Min. bei ungefähr 6000 x g. Geben Sie die QIAamp MinElute-Säule in ein sauberes 2-ml-Waschröhrchen und entsorgen Sie das Waschröhrchen mit dem Filtrat.

Die QIAamp MinElute-Säule sollte möglichst nicht mit dem Filtrat in Berührung kommen. Achten Sie darauf, den Zentrifugenrotor zu tariieren. Manche Zentrifugenrotoren können während der Beschleunigung vibrieren, was dazu führt, dass das ethanolhaltige Filtrat mit der QIAamp MinElute-Säule in Berührung gelangt. Gehen Sie beim Herausnehmen der QIAamp MinElute-Säule und des Waschröhrchens aus dem Rotor vorsichtig vor, damit das Filtrat nicht mit der QIAamp MinElute-Säule in Berührung kommt.

17. Zentrifugieren Sie 3 Minuten lang bei voller Drehzahl (ungefähr 20.000 × g), um die Membran zu trocknen.

Die Verschleppung von Ethanol in das Eluat kann sich auf manche im Anschluss durchgeführte Anwendungen störend auswirken.

18. Stellen Sie die QIAamp MinElute-Säule in ein sauberes 1,5-ml-Elutionsröhrchen (im Lieferumfang des Kits enthalten) und werfen Sie das Waschröhrchen mit dem Filtrat. Öffnen Sie vorsichtig den Deckel der QIAamp MinElute-Säule und geben Sie 20–200 µl ATE-Puffer in die Mitte der Membran.

WICHTIG: Geben Sie bei Verwendung kleiner Elutionsvolumen (< 50 µl) den ATE-Puffer in die Mitte der Membran, damit die gebundene DNA vollständig eluiert wird. QIAamp MinElute-Säulen bieten, was die Wahl des Elutionsvolumens anbelangt, Flexibilität. Wählen Sie ein Volumen, das für die im Anschluss durchgeführte Anwendung geeignet ist. Das Volumen des Eluats wird ungefähr 5 µl unter dem auf die Säule aufgetragenen Volumen des Elutionspuffers liegen.

19. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie mindestens 1 Min. bei Raumtemperatur (15–25 °C). Zentrifugieren Sie ≥ 1 Min. bei voller Drehzahl (ungefähr 20.000 × g). Die Inkubation der mit ATE-Puffer beladenen QIAamp MinElute-Säule für ungefähr 5 Minuten bei Raumtemperatur vor dem Zentrifugieren kann die DNA-Ausbeute erhöhen.

Qualitätskontrolle

Gemäß dem ISO-zertifizierten Qualitätsmanagement-System von QIAGEN wird jede Charge von QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits nach festgelegten Prüfkriterien kontrolliert, um eine einheitliche Produktqualität sicherzustellen.

Anwendungseinschränkungen

Die Kitleistung wurde anhand von formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe (FFPE-Gewebe) zur Extraktion von genomischer DNA ermittelt.

Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, für jedes Verfahren, das im Labor des Anwenders durchgeführt wird und das nicht durch die im Handbuch beschriebenen Leistungsstudien von QIAGEN abgedeckt ist, die Leistungscharakteristik des Systems selbst zu validieren.

Um das Risiko einer negativen Auswirkung auf die Ergebnisse der diagnostischen Tests zu minimieren, müssen in den anschließend durchgeführten Anwendungen geeignete Kontrollen mitgeführt werden. Zur weiteren Validierung werden die Richtlinien der International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH; Konferenz zur Harmonisierung der technischen Anforderungen) im Dokument ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Validierung analytischer Verfahren: Text und Methodik) empfohlen.

Alle diagnostischen Ergebnisse müssen unter Berücksichtigung vorliegender klinischer und labortechnischer Daten interpretiert werden.











Bei Verwendung des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits wird möglicherweise zusammen mit der DNA auch RNA gereinigt, wenn diese in der Probe vorhanden ist.











Leistungsmerkmale

Siehe www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE für Leistungsmerkmale des QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kits.

Symbole

Verpackung und Etikettierung können die folgenden Symbole enthalten:

Symbol	Bedeutung des Symbols
 <N>	Kit enthält Reagenzien für <N> Reaktionen
	Verwendbar bis
	In-vitro-diagnostisches Medizinprodukt
	Nach Lieferung
	Katalognummer
	Chargennummer
	Materialnummer
	Komponenten
	Enthält
	Anzahl

Symbol	Bedeutung des Symbols
	Notieren Sie das aktuelle Datum nach Ethanol-Zugabe in die Flasche
	Ethanol
	Hinzugeben
	Guanidinhydrochlorid
	Maleinsäure
	Global Trade Item Number (Globale Artikelnummer)
	Zulässiger Temperaturbereich
	Hersteller
	Gebrauchsanleitung beachten
	Vorsicht

Kontakt

Technische Hinweise und zusätzliche nützliche Informationen finden Sie in unserem Technischen Support-Center unter www.qiagen.com/Support. Telefonisch erreichen Sie uns unter der Rufnummer 00800-22-44-6000. Darüber hinaus ist Ihnen das Team vom Technischen Service gerne behilflich, falls Sie Rat oder weitere Informationen zu QIAGEN Produkten benötigen (Kontaktinformationen siehe hintere Umschlagseite oder unter www.qiagen.com).

Bestellinformationen

Produkt	Inhalt	Kat.-Nr.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit –zur Aufreinigung genomischer DNA aus in Paraffin eingebettetem Gewebe		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Für 50 DNA-Präparationen: 50 MinElute®-Säulen, Proteinase K, Puffer, Waschröhrchen (2 ml), Elutionsröhrchen (1,5 ml), Lyseröhrchen (2 ml)	60404

Aktuelle Lizenzinformationen und produktspezifische Haftungsausschlüsse finden Sie im jeweiligen QIAGEN Kit- oder Benutzerhandbuch. Diese stehen unter www.qiagen.com zur Verfügung oder können vom Technischen Service von QIAGEN oder dem für Sie zuständigen Außendienstmitarbeiter oder Distributor angefordert werden.

Markennamen: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIAamp[®], MinElute[®] (QIAGEN Gruppe); Eppendorf[®] (Eppendorf AG).

Eingeschränkte Nutzungsvereinbarung für das Handbuch für das QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit

Mit der Nutzung dieses Produkts erkennen Käufer und Anwender des Produkts die folgenden Bedingungen an:

1. Das Produkt darf nur gemäß den mit dem Produkt und diesem Handbuch bereitgestellten Protokollen und nur mit den Komponenten, die im Panel mitgeliefert werden, verwendet werden. QIAGEN gewährt im Rahmen seiner Eigentumsrechte keinerlei Lizenz, die zu den Panels gehörenden Komponenten mit anderen Komponenten, die nicht zu den Panels gehören, zu verwenden oder zu kombinieren, mit Ausnahme der mit dem Produkt, diesem Handbuch, bereitgestellten und in zusätzlichen, unter www.qiagen.com verfügbaren Protokollen beschriebenen Anwendungen. Einige dieser zusätzlichen Protokolle wurden von QIAGEN Anwendern für andere QIAGEN Anwender zur Verfügung gestellt. Diese Protokolle wurden von QIAGEN nicht eingehend geprüft oder optimiert. QIAGEN übernimmt für diese Protokolle keine Garantie und garantiert auch nicht, dass sie keine Rechte Dritter verletzen.
2. Über die ausdrücklich erwähnten Lizenzanwendungen hinaus übernimmt QIAGEN keinerlei Garantie dafür, dass dieses Panel und/oder die mit diesem Panel durchgeführte(n) Anwendung(en) die Rechte Dritter nicht verletzen.
3. Dieses Panel und die zugehörigen Komponenten sind für die einmalige Verwendung lizenziert und dürfen nicht wiederverwendet, wiederaufgearbeitet oder weiterverkauft werden.
4. QIAGEN lehnt außer der ausdrücklich erklärten Lizenzgewährung jede weitere Lizenzgewährung ab, sowohl ausdrücklich als auch konkludent.
5. Käufer und Anwender des Panels stimmen zu, keinerlei Schritte zu unternehmen oder anderen die Einleitung von Schritten zu gestatten, die zu unerlaubten Handlungen im obigen Sinne führen oder solche erleichtern könnten. QIAGEN kann die Verbote dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung an jedem Ort gerichtlich geltend machen und wird sämtliche Ermittlungs- und Gerichtskosten, inklusive Anwaltsgebühren, zurückfordern, die ihr bei der Geltendmachung dieser eingeschränkten Nutzungsvereinbarung oder irgendeines ihrer geistigen Eigentumsrechte im Zusammenhang mit dem Panel und/oder seinen Komponenten entstehen.

Aktualisierte Nutzungs- und Lizenzbedingungen finden Sie im Internet unter www.qiagen.com.

Feb-17 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, alle Rechte vorbehalten.

Bestellungen www.qiagen.com/contact | Technischer Support support.qiagen.com | Website www.qiagen.com