

декември, 2017 г.

# Страница от протокол QIAasymphony<sup>®</sup> SP

Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP и Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

Този документ е Страница от протокол Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP и Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP QIAasymphony SP, R3,  
за QIAasymphony DSP DNA Mini Kit, версия 1.

## Обща информация

QIAsymphony DSP DNA Kit е предназначен за ин витро диагностика.

Тези протоколи са предназначени за пречистване на пълна ДНК от тъкани и фиксирани с формалин, вградени в парафин (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) тъкани с използване на QIAsymphony SP и QIAsymphony DSP DNA Mini Kit.

В зависимост от вида на пробата се препоръчва да се използва или протокол за ниско съдържание (low content, LC), или за високо съдържание (high content, HC). При обработка по протокол за високо съдържание тъканите осигуряват повишен добив на ДНК, а при необходимост от висока концентрация на ДНК може да се използва протокол за ниско съдържание в комбинация с малък обем елуат (50 µl). За тъкан FFPE препоръчваме използване на протокол за ниско съдържание.

### Протокол за ниско съдържание

<b>Набор</b>	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (кат. № 937236)
<b>Материал на пробата</b>	Тъкан FFPE и тъкан* В един препарат могат да бъдат комбинирани до 4 тъканни секции FFPE, всяка от които с дебелина до 10 µm, или 8 секции с дебелина до 5 µm и повърхностна площ до 250 mm <sup>2</sup> .
<b>Име на протокола</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Набор по подразбиране за контрол на анализа</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Обем на елуиране</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl или 400 µl
<b>Необходима софтуерна версия</b>	Версия 4.0 или по-висока

\* За информация относно тъканните проби вижте протокола за високо съдържание.

### Протокол за високо съдържание

<b>Набор</b>	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (кат. № 937236)
<b>Материал на пробата</b>	Тъкан Ако не разполагате с информация за очаквания добив, препоръчваме да започнете с проба с 25 mg материал. В зависимост от получения добив в последващите препарати размерът на пробата може да бъде увеличен.
<b>Име на протокола</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Набор по подразбиране за контрол на анализа</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Обем на елуиране</b>	100 µl, 200 µl или 400 µl
<b>Необходима софтуерна версия</b>	Версия 4.0 или по-висока

## Необходими, но непредоставени материали

### За всички видове проби

- Буфер ATL, 4 x 50 ml (кат. № 939016)
- За минимално съдържание на РНК: DNase-free RNase A (изходен разтвор със 100 mg/ml)

### За тъкан FFPE (депарафиниране без ксилен)

- Разтвор за депарафиниране (кат. № 939018)

### За тъкан FFPE (депарафиниране с използване на ксилен)

- Ксилен (99 – 100%)
- Етанол (96 – 100%)\*

## Чекмедже „Sample“ (Проба)

<b>Вид проба</b>	Тъкан FFPE и тъкан
<b>Въвеждан обем на пробата</b>	220 µl (изискван за проба, за протокол) <sup>†</sup>
<b>Обработка обем на проба</b>	200 µl
<b>Първични епруветки за проби</b>	Неприложимо
<b>Вторични епруветки за проби</b>	За повече информация вижте <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
<b>Вложки</b>	Зависи от вида на използваната епруветка за проба, вижте <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

<sup>†</sup> И за двата протокола за ниско и високо съдържание системата няма да разпознава дали обемът на пробата е под 220 µl, тъй като прехвърлянето на пробата се извършва без детекция на нивото на течността. Ето защо се уверете, че входният обем на пробата е 220 µl.

n/a = неприложимо.

## Чекмедже „Reagents and Consumables“ (Реактиви и консумативи)

<b>Позиция A1 и/или A2</b>	Касета за реактив
<b>Позиция B1</b>	Неприложимо
<b>Държач на стойка за крайници 1 – 17</b>	Филтърни крайници за еднократна употреба, 200 µl или 1500 µl
<b>Държач на кутия 1 – 4</b>	Кутии, съдържащи касети за подготовка на проби или капацити 8-Rod

n/a = неприложимо.

\* Не използвайте денатуриран алкохол, съдържащ допълнителни вещества като метанол и метилетилкетон.

## Чекмедже „Waste“ (Отпадък)

Държач на кутия 1 – 4	Празни кутии
Държач за торба за отпадъци	Торба за отпадъци
Държач за бутилка за течни отпадъци	Празна бутилка за течни отпадъци

## Чекмедже „Eluate“ (Елуат)

Стойка за елуиране (препоръчваме използване на слот 1, позиция за охлаждане)	За повече информация вижте <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .
--	---

## Необходимо пластмасово лабораторно оборудване

Лабораторно оборудване от пластмаса	Една партида, 24 проби*	Две партиди, 48 проби*	Три партиди, 72 проби*	Четири партиди, 96 проби*
Филтърни накрайници за еднократна употреба, 200 µl <sup>†‡</sup>	26	50	74	98
Филтърни накрайници за еднократна употреба, 1500 µl <sup>†‡</sup>	72	136	200	264
Касети за подготовка на проби <sup>§</sup>	21	42	63	84
Капази 8-Rod <sup>¶</sup>	3	6	9	12

\* Използването на по-малко от 24 проби на партида намалява броя на необходимите филтърни накрайници за еднократна употреба за един анализ.

<sup>†</sup> В една стойка за филтърни накрайници има 32 филтърни накрайника.

<sup>‡</sup> Броят на необходимите филтърни накрайници включва филтърни накрайници за 1 инвентарно сканиране на касета с реагент.

<sup>§</sup> В една кутия има 28 касети с проби.

<sup>¶</sup> В една кутия има дванадесет капака 8-Rod.

**Забележка:** В зависимост от настройките, посоченият брой на филтърните накрайници може да се различава от броя, показван на сензорния екран. Препоръчваме зареждане на максималния възможен брой накрайници.

## Обем на елуиране

Обемът на елуиране се избира върху сензорния екран. В зависимост от вида на пробата и съдържанието на ДНК окончателният обем на елуата може да варира до 15 µl по-малко от избрания обем. Поради факта, че обемът на елуата може да варира, когато използвате автоматизирана система за анализ, която не проверява обема на елуата преди прехвърляне, препоръчваме да проверите действителния обем на елуата. Елуирането в по-малки обеми увеличава крайната концентрация на ДНК, но леко понижава добива. Препоръчваме да използвате обем на елуиране, подходящ за предвидения последващ анализ по веригата.

## Подготовка на материала на пробата

Когато работите с химикали, винаги носете подходящо лабораторно облекло, ръкавици за еднократна употреба и предпазни очила. За повече информация се обърнете към съответните информационни листове за безопасност (ИЛБ), предоставени от доставчика на продукта.

### Важно указание, преди да започнете

- Магнитните частици QIASymphony пречистват както РНК, така и ДНК, ако и двете присъстват в пробата. За свеждане на съдържанието на РНК в пробата до минимум добавете към пробата RNase A на етапа, посочен в съответния протокол за предварителна обработка.

### Неща, които трябва да бъдат направени, преди да започнете

- Проверете за бяла утайка в буфера ATL. При необходимост инкубирайте в продължение на 30 минути при 37° C, като разтърсвате периодично, за да разтворите утайката.
- Настройте ThermoMixer® или шейкър-инкубатора на температурата, необходима за съответната предварителна обработка.\*

\* Уверете се, че апаратите са редовно проверявани, поддържани и калибрирани съгласно препоръките на производителя.

## Тъкани

За пречистване на ДНК могат да се използват свежи и замразени тъкани. Добивът и качеството на ДНК ще зависи от типа тъкан, източника и условията на съхранение. Преди обработката свежата тъкан може да се нареже на малки парчета и да се съхранява при  $-20^{\circ}\text{C}$  или  $-80^{\circ}\text{C}$ . Като цяло препоръчваме да използвате протокола за високо съдържание, който ще осигури по-високи добиви на ДНК. Протоколът за ниско съдържание, в комбинация с 50  $\mu\text{l}$  обем на елуиране, се препоръчва, само ако са необходими високи концентрации на ДНК за последващ анализ по веригата. Ако няма информация за очаквания добив, препоръчваме да започнете с проба с 25 mg материал, като използвате протокола за високо съдържание и 200  $\mu\text{l}$  обем на елуиране. В зависимост от получения добив в последващите препарати размерът на пробата може да бъде увеличен или обемът на елуиране да бъде намален. Имайте предвид, че претоварването с препарати в комбинация с малки обеми на елуиране може да доведе до пренос на магнитни частици в елуата и би могло да наруши чистотата на ДНК и последващи анализи по веригата.

### Протокол за предварителна обработка на тъканите

1. Прехвърлете тъканната проба в 2 ml микроцентрифужна епруветка (не е доставена).
2. Добавете 220  $\mu\text{l}$  буфер ATL.
3. Добавете 20  $\mu\text{l}$  протеиназа К и разбъркайте с почукване на епруветката.

**Забележка:** Използвайте протеиназа К от ензимната стойка на QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Епруветката се поставя в ThermoMixer или в шейкър-инкубатор и се инкубира при  $56^{\circ}\text{C}$  с разклащане при 900 об./мин, докато тъканта се лизира напълно.

**Забележка:** Времето за лизиране варира в зависимост от обработвания тип тъкан. За повечето тъкани лизирането завършва в рамките на 3 часа. Ако след 3 часа лизисът е непълен, което се установява от присъствието на неразтворим материал или силно вискозни лизати, времето за лизиране може да бъде удължено или неразтворимият материал – да бъде отстранен чрез центрофугиране, както е описано в етап 6. Възможно е лизиране през нощта, което не се отразява върху препарата.

5. За да сведете до минимум съдържанието на РНК в пробата, добавете 4  $\mu\text{l}$  RNase А (100 mg/ml) и инкубирайте за 2 минути при стайна температура ( $15 - 25^{\circ}\text{C}$ ), преди да продължите с етап 6.

6. Хомогенизирайте пробата с неколkokратно пипетиране нагоре-надолу.  
**Забележка:** Ако все още присъстват парчета от неразтворим материал, центрофугирайте при 3000 x *g* в продължение на 1 минута.
7. Внимателно прехвърлете 220 µl от супернатанта в епруветки за проби, съвместими с носача за проби на QIA Symphony SP.  
За пълен списък на съвместимите епруветки за проби вижте [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Препоръчваме да се използват 2 ml епруветки (напр. Sarstedt® кат. № 72.693 или 72.608).

## Тъкан FFPE

Стандартните процедури за фиксиране с формалин и вграждане в парафин винаги водят до значителна фрагментация на нуклеиновите киселини. За да ограничите степента на фрагментация на ДНК, не забравяйте да:

- Фиксирате тъканните проби в 4 – 10% формалин възможно най-бързо след хирургичното им отстраняване
- Използвайте време на фиксиране от 14 – 24 часа (по-дългите времена на фиксиране водят до по-засилена фрагментация на ДНК, което води влошаване на резултатите от последващи анализи по веригата)
- Преди вграждане извършете пълно дехидратиране на пробите (остатъчният формалин може да потисне разграждането с протеиназа K)

Изходният материал за пречистване на ДНК трябва да бъдат прясно отрязани секции от тъкан FFPE. В един препарат могат да бъдат обработени до 4 секции, всяка с дебелина до 10 µm, или 8 секции с дебелина до 5 µm и повърхностна площ до 250 mm<sup>2</sup>. Ако няма информация за характера на изходния материал, препоръчваме да се започне с не повече от 3 секции в един препарат. В зависимост от добива и чистотата на ДНК в следващите препарати е възможно да се използват до 8 секции.

**Забележка:** Протоколите за тъкан на FFPE са специално разработени за съвместно пречистване на малки количества РНК. Това ще доведе до по-ниска измерена фотометрична стойност в сравнение със стойностите, получени с ръчния набор QIAamp® DSP ДНК FFPE Tissue.

## Протокол за предварителна обработка за тъкан на FFPE

### Метод 1: депарафиниране с използване на разтвор за депарафиниране

1. С помощта скалпел отрежете излишния парафин от блока с проби.
2. Отрежете до 4 секции с дебелина 10 µm или до 8 секции с дебелина 5 µm.  
**Забележка:** Ако повърхността на пробата е изложена на въздух, изхвърлете първите 2 – 3 секции.
3. Незабавно поставете секциите в 2 ml епруветка Sarstedt (не е доставена, каталожен № 72.693 или 72.608), съвместима с носача за проби на QIAAsymphony SP.
4. Добавете към секциите 200 µl буфер ATL.
5. Добавете 20 µl протеиназа K.  
**Забележка:** Използвайте протеиназа K от ензимната стойка на QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Добавете 160 µl или 320 µl разтвор за депарафиниране (вижте таблицата по-долу) и разбъркайте чрез интензивно вихрово разбъркване.

Дебелината на секциите	Брой секции	Обем на разтвора за депарафиниране
5 µm	1 – 4	160 µl
	5 – 8	320 µl
10 µm	1 – 2	160 µl
	3 – 4	320 µl

7. Поставете епруветката в ThermoMixer или шейкър-инкубатор и инкубирайте при 56° C в продължение на 1 час при разклащане при 1000 об./мин, докато тъканта се лизира напълно.  
**Забележка:** Времето за лизиране варира в зависимост от обработвания тип тъкан. За повечето тъкани лизирането завършва в рамките на 1 час. Ако след 1 часа лизисът е непълнен, което се установява от присъствието на неразтворим материал, времето за лизиране може да бъде удължено или неразтворимият материал да бъде утаен чрез центрофугиране, както е описано в етап 10. Възможно е лизиране през нощта, което не се отразява върху препарата.



8. Инкубирайте при 90° C в продължение на 1 час.  
**Забележка:** Инкубирането при 90° C в буфер ATL частично обръща формалдехидната модификация на нуклеиновите киселини. По-дългите инкубационни времена или по-високите температури на инкубация могат да доведат до по-фрагментирана ДНК. При използване на само един нагревателен блок, след инкубиране при 56° C, оставете пробата на стайна температура, докато нагревателният блок достигне 90° C.
9. За да сведете до минимум съдържанието на РНК в пробата, добавете 2 µl RNase A (100 mg/ml) към долната фаза и инкубирайте за 2 минути при стайна температура, преди да продължите с етап 10. Оставете пробата да се охлади до стайна температура, преди да добавите RNase A.
10. Центрофугирайте при пълна скорост в продължение на 1 минута при стайна температура.
11. Внимателно прехвърлете епруветките (съдържащи и двете фази) върху носача за проби на QIAasymphony SP.

#### Метод 2: депарафиниране с ксилен

1. С помощта скалпел отрежете излишния парафин от блока с проби.
2. Отрежете до 4 секции с дебелина 10 µm или до 8 секции с дебелина 5 µm.  
**Забележка:** Ако повърхността на пробата е изложена на въздух, изхвърлете първите 2 – 3 секции.
3. Незабавно поставете секциите в микроцентрифужна епруветка от 1,5 или 2 ml (не са предоставени) и добавете към пробата 1 ml ксилен. Затворете капака и извършете енергично вихрово разбъркване в продължение на 10 секунди.
4. Центрофугирайте при пълна скорост в продължение на 2 минути при стайна температура.
5. Отстранете супернатанта чрез пипетиране. Не отстранявайте нито една от утайките.
6. Добавете към утайката 1 ml етанол (96 – 100%) и извършете енергично вихрово разбъркване.  
**Забележка:** Етанолът извлича остатъчният ксилен от пробата.
7. Центрофугирайте при пълна скорост в продължение на 2 минути при стайна температура.
8. Отстранете супернатанта чрез пипетиране. Не отстранявайте нито една от утайките.  
**Забележка:** Внимателно отстранете остатъчния етанол, като използвате фин накрайник за пипета.

9. Отворете епруветката и инкубирайте при стайна температура (15 – 25° C) в продължение на 10 минути, или докато се изпари целият остатъчен етанол.  
**Забележка:** Инкубирането може да се извършва при температури до 37° C.
10. Отново суспендирайте утайката в 220 µl буфер ATL.
11. Добавете 20 µl протеиназа К и извършете вихрово разбъркване.  
**Забележка:** Използвайте протеиназа К от ензимната стойка на QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.
12. Инкубирайте при 56° C в продължение на 1 час (или докато пробата бъде напълно лизирана).  
**Забележка:** Времето за лизиране варира в зависимост от обработвания тип тъкан. За повечето тъкани лизирането завършва в рамките на 1 час. Ако след 1 часа лизисът е непълен, което се установява от присъствието на неразтворим материал, времето за лизиране може да бъде удължено или неразтворимият материал да бъде отстранен чрез центрофугиране, както е описано в етап 16. Възможно е лизиране през нощта, което не се отразява върху препарата.
13. Инкубирайте при 90° C в продължение на 1 час.  
**Забележка:** Инкубирането при 90° C в буфер ATL частично обръща формалдехидната модификация на нуклеиновите киселини. По-дългите инкубационни времена или по-високите температури на инкубация могат да доведат до по-фрагментирана ДНК. При използване на само един нагревателен блок, след инкубиране при 56° C, оставете пробата на стайна температура, докато нагревателният блок достигне 90° C.
14. Накрая центрофугирайте пробата, за да отстраните капки от вътрешната страна на капака.
15. За да сведете до минимум съдържанието на РНК в пробата, добавете 2 µl RNase A (100 mg/ml) и инкубирайте за 2 минути при стайна температура, преди да продължите с етап 16. Оставете пробата да се охлади до стайна температура, преди да добавите RNase A.
16. Внимателно прехвърлете 220 µl от лизата в епруветки за проби, съвместими с носача за проби на QIAasymphony SP.  
**Забележка:** Ако лизатите съдържат неразграден материал, центрофугирайте при пълна скорост в продължение на 2 минути при стайна температура, преди да прехвърлите супернатанта в епруветки за проби. За пълен списък на съвместимите епруветки за проби вижте [www.qiagen.com/goto/dsphandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks). Препоръчваме да се използват 2 ml епруветки (напр. Sarstedt, кат. № 72.693 или 72.608).

## История на редакции

История на редакциите на документа	
R3 12/2017	Актуализация на софтуер QIASymphony Software, версия 5.0

За актуална информация относно лицензирането и конкретните за продуктите правни бележки вижте ръководството или наръчника за потребителя на набора QIAGEN®. Ръководствата и наръчните за потребителя на набора QIAGEN са достъпни на адрес **www.qiagen.com** или могат да бъдат заявени от отдела за технически услуги на QIAGEN или местния ви дистрибутор.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG).  
Регистрираните имена, търговските марки и т.н., използвани в този документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не трябва да се считат за незащитени от закона.  
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, всички права запазени.

---

Поръчване [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | Техническа поддръжка [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com) | Уебсайт [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

