

Februari 2017

Handleiding QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue-kit



Versie 1

IVD

Voor diagnostisch gebruik in vitro

CE

REF

60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
DUITSLAND

R3 **MAT**

1062689NL



Inhoudsopgave

Beoogd gebruik.....	5
Samenvatting en uitleg	5
Principe van de procedure	6
Meegeleverde materialen	8
Inhoud van de kit.....	8
Benodigde maar niet meegeleverde materialen	9
Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen	10
Bewaren en hanteren van reagentia.....	11
Bewaren en hanteren van monsters.....	12
Procedure	13
Vorbereiding van buffers	14
Uitgangsmateriaal	15
Handelswijze om kruiscontaminatie te voorkomen	16
Centrifugatie.....	17
QIAamp MinElute-kolommen verwerken in een microcentrifuge.....	17
Elutie van gezuiverd DNA	18
Protocol: isolatie van genomisch DNA uit FFPE-weefselcoupes.....	19
Kwaliteitscontrole.....	23
Beperkingen.....	23
Prestatiekenmerken	24
Symbolen	24
Contactgegevens.....	25
Bestelinformatie	26

Beoogd gebruik

De QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit is een systeem voor isolatie en zuivering van genomisch DNA uit in formaline gefixeerde, in paraffine ingebedde (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) biologische monsters, met behulp van silicamembraan-technologie (QIAamp-technologie).

Het product is bedoeld voor gebruik door professionele gebruikers zoals laboranten en artsen, die training hebben gehad in het gebruik van moleculair-biologische technieken voor in-vitrodiagnostiek (IVD); het is bedoeld voor handmatige monstervoorbereiding en levert geen kwalitatieve of kwantitatieve testresultaten.

Samenvatting en uitleg

De QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit wordt gebruikt voor het zuiveren van DNA uit FFPE-weefselcouples. Daarbij wordt gebruikgemaakt van de veelgebruikte QIAamp DNA Micro-technologie voor zuivering van genomisch en mitochondriaal DNA uit monsters met een klein volume of kleine afmeting. In de kit wordt gebruikgemaakt van de selectieve bindingseigenschappen van een silicamembraan in combinatie met flexibele elutievolumes.

Dankzij de omstandigheden tijdens de lyse kan het genomisch DNA efficiënt uit FFPE-weefselcouples worden gezuiverd zonder dat ze overnacht worden geïncubeerd. Door incubatie bij een hogere temperatuur na digestie door proteïnase K wordt de crosslinking van het vrijgekomen DNA door formaline gedeeltelijk verbroken, wat zowel de opbrengst als de kwaliteit van het DNA voor verdere analyse ten goede kan komen. Let op: DNA uit FFPE-monsters heeft doorgaans een lager molecuulgewicht dan DNA uit verse of ingevroren monsters. De mate van fragmentatie is afhankelijk van het type monster, hoe oud het monster is en de gebruikte fixatie-omstandigheden.

Na lyse kunnen er met de eenvoudige procedure meerdere monsters tegelijk met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit worden verwerkt.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden beschreven in de prestatieonderzoeken van QIAGEN in de handleiding.

Principe van de procedure

De procedure die wordt gehanteerd in de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit bestaat uit zes stappen (Afbeelding 1):

- Verwijderen van paraffine: de paraffine wordt opgelost in xyleen en verwijderd
- Lyse: het monster wordt bij 56 °C onder denaturerende omstandigheden, in aanwezigheid van proteïnase K, gelyseerd
- Verhitten: door incubatie bij 90 °C wordt crosslinking door formaline ongedaan gemaakt
- Binden: DNA bindt aan het membraan en verontreinigende stoffen stromen erdoorheen
- Wassen: achtergebleven verontreinigingen worden weggespoeld
- Elueren: zuiver, geconcentreerd DNA wordt van het membraan geëluëerd

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure



Afbeelding 1. Procedure met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit.

Meegeleverde materialen

Inhoud van de kit

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
Catalogusnr.			60404
Aantal reacties			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (QIAamp MinElute kolommen met wasbuisjes)	COL	50
WT	Wash Tubes (2 ml) (Wasbuisjes (2 ml))	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (1.5 ml) (Elutiebuisjes (1,5 ml))	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (2 ml) (Lysebuisjes (2 ml))	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (Buffer voor weefselyse)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer (Lysebuffer)*	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1 (concentrate) (Wasbuffer 1 (concentraat))*	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (concentrate) (Wasbuffer 2 (concentraat))†	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer (Elutiebuffer)†	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K (Proteïnase K)	PROTK	1,25 ml
–	Gebruiksaanwijzing (Handleiding)	H B	1

* Bevat een guanidinezout. Niet geschikt voor gebruik met bleekhoudende desinfectiemiddelen. Zie pagina 10 voor waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen.

† Bevat natriumazide als conserveermiddel.

Benodigde maar niet meegeleverde materialen

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (safety data sheets, SDS) die bij de leveranciers van de producten verkrijgbaar zijn.

Reagentia

- Xyleen
- Ethanol (96–100%)*

Verbruiksartikelen

- Als men besluit andere buisjes te gebruiken dan de buisjes in de kit, raden wij aan microcentrifugebuisjes van 1,5 ml of 2 ml te gebruiken (voor lysestappen) en microcentrifugebuisjes van 1,5 ml (voor elutiestappen) (verkrijgbaar van Eppendorf® [Safe-Lock: cat.nr. voor de VS 022363204; cat.nr. voor Europa 0030 120.086], of Sarstedt [cat.nr. 72.690]). Wij raden aan DNase/RNase-vrije conische buisjes te gebruiken met dopjes die goed dicht kunnen.
- Pipetten en pipetpuntjes (om kruiscontaminatie te voorkomen raden wij dringend aan gebruik te maken van pipetpuntjes met aerosolfilter)

Apparatuur

- Thermomixer[†], schudapparaat met verwarming, verwarmingsblok of waterbad met mogelijkheden voor incubatie bij 56 °C, 70 °C en 90 °C
- Microcentrifuge[†] met rotor voor buisjes van 2 ml
- Vortex

* Gebruik geen gedestilleerde alcohol, aangezien daarin andere stoffen aanwezig zijn zoals methanol of methylethylketon.

[†] Om te zorgen voor een goede verwerking van monsters tijdens de procedures met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit raden wij ten zeerste aan alle instrumenten te kalibreren volgens de aanbevelingen van de fabrikanten.

Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen

Voor diagnostisch gebruik in vitro

Draag bij het werken met chemicaliën altijd een geschikte laboratoriumjas, wegwerphandschoenen en een veiligheidsbril. Raadpleeg voor meer informatie de desbetreffende veiligheidsinformatiebladen (SDS). Deze zijn als handige, compacte PDF-bestanden beschikbaar op www.qiagen.com/safety. Hier kunt u ook de SDS voor elke QIAGEN®-kit en elk onderdeel van de kit vinden, bekijken en afdrukken.



VOORZICHTIG: Voeg GEEN bleekmiddel of zuuroplossingen rechtstreeks toe aan het afval van monsterbereiding.

Buffer AL en buffer AW1 bevatten guanidinehydrochloride, dat met bleekwater sterk reactieve verbindingen kan vormen.

Reinig eventueel gemorste vloeistof die deze buffers bevat met een geschikt laboratoriumreinigingsmiddel en water. Als de gemorste vloeistof potentieel infectieuze agentia bevat, reinig de verontreinigde plaats dan eerst met laboratoriumreinigingsmiddel en water, en daarna met 1% (v/v) natriumhypochloriet.

De volgende gevarenaanduidingen en voorzorgsmaatregelen zijn van toepassing op de onderdelen van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit.

Buffer AL



Bevat: guanidinehydrochloride; maleïnezuur. Let op! Kan schadelijk zijn bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Bij aanhoudende oogirritatie: een arts raadplegen. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten. Contactlenzen verwijderen, indien mogelijk. Blijven spoelen. Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken. BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen. Bij huidirritatie: een arts raadplegen. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.

Buffer ATL



Let op! Licht irriterend voor de huid. Bij huidirritatie: een arts raadplegen.

Buffer AW1



Bevat: guanidinehydrochloride. Let op! Schadelijk bij inslikken en bij inademing. Veroorzaakt huidirritatie. Veroorzaakt ernstige oogirritatie. Bij onwel voelen een ANTIGIFCENTRUM of een arts raadplegen. Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkend afvalverwerkingsbedrijf. Verontreinigde kleding uittrekken en wassen alvorens deze opnieuw te gebruiken. Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen.

Proteïnase K



Bevat: Proteïnase K. Gevaarlijk! Licht irriterend voor de huid. Kan bij inademing allergie- of astmasymptomen of ademhalingsmoeilijkheden veroorzaken. Inademing van stof/rook/gas/nevel/damp/spuitnevel vermijden. Inhoud/verpakking afvoeren naar een erkend afvalverwerkingsbedrijf. Bij ademhalingsmoeilijkheden: een ANTIGIFCENTRUM of arts raadplegen. NA INADEMING: Bij ademhalingsmoeilijkheden het slachtoffer in de frisse lucht brengen en laten rusten in een houding die het ademen vergemakkelijkt. Adembescherming dragen.

Bewaren en hanteren van reagentia

QIAamp MinElute-kolommen dienen na aankomst bij 2–8 °C te worden bewaard en kunnen gebruikt worden tot de uiterste gebruiksdatum die op de kitdoos is vermeld.

Alle buffers kunnen worden bewaard bij kamertemperatuur (15–25 °C) en zijn stabiel tot de uiterste gebruiksdatum van de kit. Buffers AW1 en AW2 kunnen na reconstitutie worden bewaard bij kamertemperatuur (15–25 °C) gedurende maximaal 1 jaar of tot de uiterste gebruiksdatum van de kit, als die eerder valt.

De QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit bevat een gebruiksklare proteïnase K-oplossing, die geleverd wordt in een speciaal samengestelde opslagbuffer. Proteïnase K is bij kamertemperatuur (15–25 °C) stabiel tot de uiterste gebruiksdatum van de kit.

Bewaren en hanteren van monsters

Volg, om fragmentatie van het DNA zo veel mogelijk te beperken, standaardprocedures bij fixatie met formaline en inbedden in paraffine. Let daarbij op het volgende:

- Fixeer de monsters in formaline volgens het protocol van uw laboratorium (over het algemeen geldt 10% neutraal gebufferde formaline als aanvaardbaar), zo snel mogelijk na chirurgische verwijdering.
- Houd een fixatietijd aan van 14–24 uur. Fixeer niet te lang, omdat bij langdurige fixatie (bijvoorbeeld > 24 uur) ernstiger fragmentatie van het DNA kan optreden, wat een nadelige invloed kan hebben op de resultaten van verdere analyse.
- Zorg ervoor dat de monsters grondig gedehydrateerd zijn voordat ze worden ingebed (resten formaline kunnen de digestie door proteïnase K verstoren).

Het DNA wordt geëluëerd in buffer ATE en kan onmiddellijk worden gebruikt in amplificatiereacties of worden opgeslagen (omstandigheden afhankelijk van de behoeften van de gebruiker). Raadpleeg de handleidingen van de betreffende kits voor aanbevolen omstandigheden voor het bewaren van monsters voor specifieke vervolganalyses met QIAGEN-kits.

Procedure

Wat u moet weten voor u begint

- Alle reagentia die geleverd worden in de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit zijn uitsluitend bedoeld voor gebruik met de andere reagentia in dezelfde QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit. Voor optimale prestaties van de kit dienen de reagentia in de kit niet door andere reagentia te worden vervangen.
- Controleer na ontvangst van de kit de onderdelen van de kit op beschadiging. Neem in geval van beschadiging van de verpakkingen of de flesjes met buffer contact op met de technische dienst van QIAGEN of met uw plaatselijke distributeur. Raadpleeg in geval van gemorste vloeistof “Waarschuwingen en voorzorgsmaatregelen”, op pagina 10. Gebruik geen onderdelen van de kit die beschadigd zijn; anders zal de kit mogelijk minder goed werken.
- Gebruik geen onderdelen uit andere kits met de kit die u op dit moment gebruikt, tenzij de partijnummers identiek zijn.
- Voorkom microbiële besmetting van de reagentia van de kit.
- Deze kit mag alleen gebruikt worden door mensen die getraind zijn in laboratoriumwerkwijzen voor in-vitrodiagnostiek.
- Draag altijd latex of vinyl handschoenen bij het hanteren van reagentia en monsters om contaminatie vanaf de huid of door stof van laboratoriumapparatuur te voorkomen. Op de handen en op stofdeeltjes kunnen bacteriën en schimmels aanwezig zijn; dit zijn veelvoorkomende bronnen van besmetting. Trek regelmatig schone handschoenen aan en houd alle buisjes gesloten.
- Gooi ongebruikte buffers, vloeibaar afval en resten van monsters weg volgens de plaatselijk geldende werkwijze.

- Bij gebruik van eigen reageerbuisjes wordt het gebruik van DNase/RNase-vrije conische polypropyleen buisjes van 1,5–2 ml voor eenmalig gebruik met een lage bindingsaffiniteit, met dopjes die goed dicht kunnen, aangeraden voor alle stappen tijdens de zuivering.
- Voer alle centrifugatiestappen uit bij kamertemperatuur (15–25 °C).
- Bewaar alle buffers bij kamertemperatuur (15–25 °C) en meng ze grondig voor gebruik.
- Stel een ThermoMixer of schudapparaat met verwarming in op 56 °C voor gebruik in stap 11. Als er geen thermomixer of schudapparaat met verwarming beschikbaar is, kan in plaats daarvan een verwarmingsblok of waterbad worden gebruikt.
- Los eventueel precipitaat in buffer AL of buffer ATL op door de buffer onder voorzichtig schudden te verwarmen tot 70 °C.
- Zorg dat buffer AW1 en buffer AW2 zijn voorbereid volgens de instructies hieronder.
- Tijdens de procedures voor kwaliteitscontrole van QIAGEN worden op iedere afzonderlijke kitpartij functionele testen uitgevoerd. Meng daarom geen reagentia uit kits uit verschillende partijen, en voeg geen reagentia uit verschillende partijen samen.

Vorbereitung van buffers

Vorbereitung van buffer ATL

- Controleer vooraf of er zich in buffer ATL geen precipitaat heeft gevormd. Los eventueel precipitaat op door de buffer onder voorzichtig schudden te verwarmen tot 70 °C.

Vorbereitung van buffer AL

- Controleer vooraf of er zich in buffer AL geen precipitaat heeft gevormd. Los eventueel precipitaat op door de buffer onder voorzichtig schudden te verwarmen tot 70 °C.

Vorbereiding van buffer AW1

- Voeg 25 ml ethanol (96–100%) toe aan het flesje met 19 ml geconcentreerde buffer AW1. Vink het vakje op het etiket van het flesje aan, om aan te geven dat de ethanol is toegevoegd. Buffer AW1 kan na reconstitutie worden bewaard bij kamertemperatuur (15–25 °C) gedurende maximaal 1 jaar of tot de uiterste gebruiksdatum van de kit, als die eerder valt. Wij raden aan om op het etiket van de buffer te schrijven op welke datum de buffer is gereconstitueerd.

NB: Schud de gereconstitueerde buffer AW1 voor het begin van de procedure om hem te mengen.

Vorbereiding van buffer AW2

- Voeg 30 ml ethanol (96–100%) toe aan het flesje met 13 ml geconcentreerde buffer AW2. Vink het vakje op het etiket van het flesje aan, om aan te geven dat de ethanol is toegevoegd. Buffer AW2 kan na reconstitutie worden bewaard bij kamertemperatuur (15–25 °C) gedurende maximaal 1 jaar of tot de uiterste gebruiksdatum van de kit, als die eerder valt. Wij raden aan om op het etiket van de buffer te schrijven op welke datum de buffer is gereconstitueerd.

NB: Schud de gereconstitueerde buffer AW2 voor het begin van de procedure om hem te mengen.

Uitgangsmateriaal

Het uitgangsmateriaal voor de zuivering van het DNA bestaat uit coupes van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel (liefst vers gesneden). Er kunnen meerdere coupes tegelijkertijd worden verwerkt. Als er geen informatie beschikbaar is over de aard van het uitgangsmateriaal, is het aan te raden te beginnen met niet meer dan drie coupes tegelijk.

Het is aan de gebruiker om het aantal coupes, de dikte van coupes en het oppervlaktegebied van coupes te optimaliseren voor alle eventuele procedures die in hun laboratorium worden gebruikt. Als de kit wordt gebruikt in combinatie met een kit of ander hulpmiddel van QIAGEN voor verdere verwerking of analyse, raadpleeg dan de instructies in de betreffende handleiding.

Handelswijze om kruiscontaminatie te voorkomen

Technieken waarin gebruik wordt gemaakt van nucleïnezuuramplificatie zijn erg gevoelig; bij gebruik van de QIAamp MinElute-kolommen zijn daarom de volgende voorzorgsmaatregelen noodzakelijk om kruiscontaminatie tussen verschillende monsters te voorkomen:

- Zorg dat de buisjes niet te vol zitten met weefsel.
- Gebruik bij het afschrapen van het weefsel bij ieder monster een nieuw scalpel.
- Ga zorgvuldig te werk bij het aanbrengen van het monster of de oplossing op de QIAamp MinElute-kolom. Pipetteer het monster in de QIAamp MinElute-kolom zonder de rand van de kolom te bevochtigen.
- Gebruik na het overbrengen van ieder volume vloeistof steeds een nieuwe pipetpunt. Wij raden aan gebruik te maken van pipetpunten met aerosolfilter.
- Gebruik voor de wasstappen van de monsters steeds een nieuw wasbuisje.
- Zorg dat de dopjes helemaal gesloten zijn alvorens de buisjes te vortexen of te centrifugeren.
- Zorg dat een QIAamp MinElute-kolom helemaal gesloten is alvorens hem te centrifugeren.
- Centrifugeer de microcentrifugebuisjes kort na elke vortexstap en na iedere incubatie bij 90 °C om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.
- Open niet meer dan één QIAamp MinElute-kolom tegelijk en zorg dat er geen aerosolen kunnen worden gevormd.
- Gebruik voor ieder monster een nieuw scalpel.

- Gebruik na het overbrengen van ieder volume vloeistof steeds een nieuwe pipetpunt. Om kruiscontaminatie zo veel mogelijk te voorkomen, raden wij aan gebruik te maken van pipetpunten met aerosolfilter en geen multistep-pipetten te gebruiken.
- Draag altijd wegwerphandschoenen en controleer regelmatig of deze mogelijk besmet zijn met materiaal uit een monster. Gooi de handschoenen weg als u denkt dat ze misschien besmet geraakt kunnen zijn.
- Open niet meer dan één buisje tegelijk.

Centrifugatie

De QIAamp MinElute-kolommen passen in de meeste standaard microcentrifugebuisjes van 1,5–2 ml. Extra wasbuisjes van 2 ml zijn apart verkrijgbaar (QIAGEN, cat.nr. 19201). Centrifugatie van QIAamp MinElute-kolommen gebeurt bij ongeveer 6000 x g om geluidshinder door de centrifuge te beperken. Centrifugatie bij maximale snelheid leidt niet tot een hogere DNA-opbrengst. Er zijn twee stappen waarbij centrifugatie van de QIAamp MinElute-kolommen bij de maximale snelheid wel nodig is: de centrifugatiestap voor het drogen van de kolommen na het wassen van de membranen, en de elutiestap. Ook moeten de monsters bij de maximale snelheid worden gecentrifugeerd na de xyleenbehandeling en na de wasstap met ethanol.

Alle centrifugatiestappen moeten plaatsvinden bij kamertemperatuur (15–25 °C). Centrifugatie bij lage temperaturen kan leiden tot onvolledige extractie.

QIAamp MinElute-kolommen verwerken in een microcentrifuge

- Doe altijd de dop op een QIAamp MinElute-kolom alvorens deze in de microcentrifuge te plaatsen.
- Raak het membraan van de QIAamp MinElute-kolom niet aan met de pipetpunt.
- Fracties die niet aan het membraan binden, kunnen gevaarlijk afval bevatten en dienen op de juiste wijze te worden afgevoerd.

- Om meerdere monsters tegelijkertijd efficiënt te kunnen verwerken, raden wij aan in een rek de benodigde wasbuisjes klaar te zetten zodat de QIAamp MinElute-kolommen na centrifugatie in de buisjes kunnen worden overgebracht. Gebruikte wasbuisjes met niet-gebonden vloeistof kunnen worden weggegooid, en de nieuwe wasbuisjes met de QIAamp MinElute-kolommen kunnen meteen in de microcentrifuge worden geplaatst.
- Zorg dat elk monster gedurende het gehele proces traceerbaar blijft.

Elutie van gezuiverd DNA

Voor verdere toepassingen waarvoor een klein uitgangsvolume nodig is (bijvoorbeeld sommige PCR-reacties) kan een hogere concentratie in het eluaat weliswaar de gevoeligheid van het assay verhogen, maar kunnen ook potentiële remmers van de reactie in hogere concentraties aanwezig zijn.

Een groter elutievolume geeft een lagere concentratie van het DNA in het eluaat.

Het volume van het eluaat dat wordt verkregen, kan ongeveer 5 µl minder zijn dan het volume aan buffer ATE dat op de QIAamp MinElute-kolom is aangebracht. Een elutievolume van 20 µl resulteert bijvoorbeeld in een eluaat van ≥ 15 µl. Het volume van het eluaat dat wordt verkregen, is afhankelijk van de aard van het monster.

De gebruiker is zelf verantwoordelijk voor optimalisatie van het elutievolume voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt. Raadpleeg de handleidingen van de betreffende kits voor aanbevolen elutievolumes voor specifieke vervolganalyses met QIAGEN-kits.

Incubatie van de kolom met buffer ATE bij kamertemperatuur gedurende bijvoorbeeld 5 minuten voorafgaand aan het centrifugeren kan de opbrengst verhogen. Het geëluëerde DNA kan worden opgevangen in de meegeleverde elutiebusjes van 1,5 ml. Opslagomstandigheden voor het geëluëerde DNA zijn afhankelijk van de door de gebruiker bepaalde vereisten. Raadpleeg de handleidingen van de betreffende kits voor aanbevolen opslagomstandigheden voor specifieke vervolganalyses met QIAGEN-kits.

Protocol: isolatie van genomisch DNA uit FFPE-weefselcoupes

Procedure

1. Snijd met een scalpel eventuele overmaat aan paraffine van het monsterblok.
2. Snijd coupes volgens de gebruikelijke werkwijze in het laboratorium (zie "Uitgangsmateriaal", pagina 15). Het is aan de gebruiker om het aantal coupes, de dikte van coupes en het oppervlaktegebied van coupes te optimaliseren voor alle eventuele procedures die in hun laboratorium worden gebruikt. Zorg dat de monsters gedurende de gehele procedure traceerbaar blijven.
3. Schraap met een steriel scalpel onmiddellijk het weefsel van de coupes in een meegeleverd lysebuisje. Zorg ervoor dat al het beschikbare weefsel in het buisje wordt overgebracht. Voeg 1 ml xyleen aan het monster toe, sluit het dopje en vortex stevig tot de paraffine is opgelost (bijvoorbeeld 10 sec.). Zorg dat de dop goed dicht zit om morsen van xyleen, kruiscontaminatie tussen verschillende monsters en mogelijk contact met xyleen te voorkomen.

NB: Werk in een zuurkast of een ander geschikt inperkend systeem bij gebruik van xyleen.

4. Centrifugeer ongeveer 2 minuten bij kamertemperatuur op maximale snelheid om het pellet, bestaande uit het weefsel, te verkrijgen. Herhaal deze stap als er geen pellet wordt gevormd.

NB: Centrifugatie bij lage temperaturen kan leiden tot onvolledige extractie.

5. Pipetteer het supernatant af en gooi het weg. Behoud het pellet.

Het supernatant bevat xyleen. Xyleen geldt als gevaarlijk afval en moet op de juiste wijze worden afgevoerd, met inachtneming van de plaatselijke voorschriften.

6. Voeg 1 ml ethanol (96–100%) aan het pellet toe en vortex om goed te mengen.

De ethanol zorgt voor de extractie van achtergebleven xyleen uit het monster en dient op de juiste wijze te worden afgevoerd.

7. Centrifugeer ongeveer 2 minuten bij kamertemperatuur op maximale snelheid.

Pipetteer het supernatant af. Laat het gehele pellet zitten.

Verwijder met een dunne pipetpunt eventuele achtergebleven restjes ethanol. Incubeer het open buisje bij 15–40 °C, tot alle overgebleven ethanol is verdampt. Voor een succesvolle extractie is het essentieel dat er geen restjes ethanol meer aanwezig zijn.

NB: Bij lagere incubatietemperaturen kan het langer duren tot alles verdampt is; bij hogere temperaturen kan het pellet uitdrogen, waardoor het moeilijk te resuspenderen kan zijn.

8. Resuspendeer het pellet in 180 µl buffer ATL. Voeg 20 µl proteïnase K toe en vortex om te mengen.

NB: Het pellet moet goed in de ATL-buffer geresuspendeerd zijn voor een zo hoog mogelijke opbrengst.

9. Incubeer ongeveer 1 uur bij 56 °C ± 3 °C (tot het monster volledig gelyseerd is).

10. Incubeer 1 uur ± 5 minuten bij 90 °C ± 5 °C.

Door de incubatie bij 90 °C in buffer ATL wordt de modificatie van nucleïnezuren door formaldehyde gedeeltelijk ongedaan gemaakt. Kortere incubatietijden of incubatie bij lagere temperaturen kan van invloed zijn op de kwaliteit en de opbrengst van het DNA. Als er slechts één verwarmingsblok wordt gebruikt, zet het monster dan bij kamertemperatuur na de incubatie bij 56 °C tot het verwarmingsblok op 90 °C is gekomen.

11. Centrifugeer het buisje kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.

12. Voeg 200 µl buffer AL aan het monster toe en vortex om goed te mengen. Voeg vervolgens 200 µl ethanol (96–100%) toe en vortex nogmaals om goed te mengen. Het is essentieel dat het monster, buffer AL en de ethanol onmiddellijk grondig worden gemengd door te vortexen of op en neer te pipetteren om een homogene oplossing te verkrijgen. Buffer AL en de ethanol kunnen ook vooraf worden gemengd en samen in één stap worden toegevoegd om tijd te besparen bij de verwerking van meerdere monsters. Na toevoeging van buffer AL en ethanol kan een wit precipitaat worden gevormd. Dit precipitaat heeft geen nadelig effect op de QIAamp-procedure. Werk altijd met een verse mix en gooi de mix na gebruik meteen weg.
13. Centrifugeer het buisje kort om eventuele druppeltjes aan de onderkant van de dop te verwijderen.
14. Breng het gehele lysaat zorgvuldig over naar de QIAamp MinElute-kolom (in een wasbuisje van 2 ml6000) zonder daarbij de rand te bevochtigen. Doe het dopje dicht en centrifugeer ≥ 1 minuut bij ongeveer 6000 x g. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon wasbuisje van 2 ml (meegeleverd) en gooi het wasbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg.

Als niet al het lysaat na centrifugeren door het membraan is gelopen, centrifugeer dan nogmaals bij een hogere snelheid tot de QIAamp MinElute-kolom leeg is.
15. Open de QIAamp MinElute-kolom voorzichtig en voeg 500 µl gereconstitueerde buffer AW1 toe zonder de rand te bevochtigen. Doe het dopje dicht en centrifugeer ≥ 1 minuut bij ongeveer 6000 x g. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon wasbuisje van 2 ml en gooi het wasbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg.
16. Open de QIAamp MinElute-kolom voorzichtig en voeg 500 µl gereconstitueerde buffer AW2 toe zonder de rand te bevochtigen. Doe het dopje dicht en centrifugeer ≥ 1 minuut bij ongeveer 6000 x g. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon wasbuisje van 2 ml en gooi het wasbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg.

De niet-gebonden vloeistof mag niet in aanraking komen met de QIAamp MinElute-kolom. Zorg dat de rotor van de centrifuge goed in balans is. Bij sommige centrifuges kan tijdens het afremmen vibratie van de rotor optreden, waardoor de doorgelopen

vloeistof, die ethanol bevat, in aanraking komt met de QIAamp MinElute-kolom. Ga zorgvuldig te werk als u de QIAamp MinElute-kolom en het wasbuisje uit de rotor haalt, zodat de doorgelopen vloeistof niet in aanraking komt met de QIAamp MinElute-kolom.

17. Centrifugeer ongeveer 3 minuten op maximale snelheid (ongeveer 20.000 x g) om het membraan te drogen.

Als er ethanol in het eluaat terechtkomt, kan dat negatieve gevolgen hebben voor sommige verdere toepassingen.

18. Plaats de QIAamp MinElute-kolom in een schoon elutiebusje van 1,5 ml (meegeleverd) en gooi het wasbuisje met de niet-gebonden vloeistof weg. Open het dopje van de QIAamp MinElute-kolom voorzichtig en breng 20–200 µl buffer ATE over naar het midden van het membraan.

BELANGRIJK: Breng bij kleine elutievolumes (< 50 µl) de buffer ATE op het midden van het membraan aan zodat al het gebonden DNA wordt geëluëerd. QIAamp MinElute-kolommen bieden enige flexibiliteit wat betreft het elutievolume dat wordt gebruikt. Kies een volume dat het best past bij de vereisten van de verdere toepassing. Het volume van het eluaat zal ongeveer 5 µl minder zijn dan het volume elutiebuffer dat op de kolom is aangebracht.

19. Doe het dopje dicht en incubeer ten minste 1 minuut bij kamertemperatuur (15–25 °C). Centrifugeer ≥ 1 minuut op maximale snelheid (ongeveer 20.000 x g).

Incubatie van de QIAamp MinElute-kolom met buffer ATE erop gedurende ongeveer 5 minuten bij kamertemperatuur voorafgaand aan het centrifugeren kan zorgen voor een hogere DNA-opbrengst.

Kwaliteitscontrole

Elke partij QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kits wordt, in overeenstemming met het ISO-gecertificeerde kwaliteitsbeheersysteem van QIAGEN, getest op vooraf vastgestelde specificaties, om een consistente kwaliteit van het product te waarborgen.

Beperkingen

De prestaties van de kit zijn vastgesteld met gebruik van in formaline gefixeerd, in paraffine ingebed weefsel (FFPE-weefsel) voor de isolatie van genomisch DNA.

Het is de verantwoordelijkheid van de gebruiker om de systeemprestaties te valideren voor alle procedures die in het laboratorium worden gebruikt en niet worden beschreven in de prestatieonderzoeken van QIAGEN in de handleiding.

Om het risico van een negatieve invloed op de diagnostische resultaten zo klein mogelijk te houden, dienen goede controles voor downstream-toepassingen te worden gebruikt. Voor verdere validering worden de richtlijnen van de "International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH, internationale conferentie voor harmonisatie van technische voorschriften)" in: "ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology" (ICH Q2(R1) Validatie van analysemethoden: tekst en methodologie), aanbevolen.

Diagnostische resultaten die worden gegenereerd, moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met overige klinische bevindingen of laboratoriumbevindingen.











Het kan zijn dat er bij de zuivering van DNA met de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit ook RNA wordt meegezuiverd, als dat in het monster aanwezig is.

Prestatiekenmerken

Zie www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE voor de prestatiekenmerken van de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit.

Symbolen

De volgende symbolen kunnen op de verpakking en etiketten zijn weergegeven:

Symbol	Betekenis van het symbool
	Bevat voldoende reagentia voor <N> reacties
	Uiterste gebruiksdatum
	Medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek
	Bij aankomst
	Catalogusnummer
	Partijnummer
	Materiaalnummer
	Onderdelen
	Bevat
	Nummer

Symbool

Betekenis van het symbool



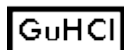
Schrijf na toevoeging van ethanol aan het flesje de huidige datum op



Ethanol



Toevoegen



Guanidinehydrochloride



Maleïnezuur



Global Trade Item Number



Temperatuurbeperring



Fabrikant



Raadpleeg de gebruiksaanwijzing



Voorzichtig

Contactgegevens

Neem voor technische ondersteuning en aanvullende informatie contact op met ons centrum voor technische ondersteuning via www.qiagen.com/Support. Ook kunt u bellen naar 00800-22-44-6000 of contact opnemen met een van de afdelingen voor technische services van QIAGEN of de plaatselijke distributeur (zie achterzijde of ga naar www.qiagen.com).

Bestelinformatie

Product	Inhoud	Cat.nr.
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit – voor het zuiveren van genomisch DNA uit in paraffine ingebed weefsel		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	Voor 50 DNA-bereidingen: 50 QIAamp MinElute®-kolommen, proteïnase K, buffers, wasbuisjes (2 ml), elutiebusjes (1,5 ml), lysebusjes (2 ml)	60404

Zie voor actuele informatie over licenties en productspecifieke vrijwaringsclausules de handleiding of gebruikershandleiding van de betreffende QIAGEN-kit. Handleidingen en gebruikershandleidingen van QIAGEN-kits zijn verkrijgbaar via www.qiagen.com of kunnen worden aangevraagd bij de technische dienst van QIAGEN of bij uw plaatselijke distributeur.

Handelsmerken: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Beperkte licentieovereenkomst voor de handleiding bij de QIAamp DSP DNA FFPE Tissue-kit

Door dit product te gebruiken, verklaart de koper of gebruiker zich akkoord met de volgende voorwaarden:

1. Het product mag uitsluitend worden gebruikt in overeenstemming met de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en mag alleen worden gebruikt met onderdelen die zich in het paneel bevinden. QIAGEN geeft onder haar intellectuele eigendom geen licentie om de bijgesloten onderdelen van dit paneel te gebruiken of samen te stellen met onderdelen die niet bij het paneel zijn meegeleverd, behalve zoals beschreven in de protocollen die bij het product en deze handleiding zijn meegeleverd en in aanvullende protocollen die beschikbaar zijn op www.qiagen.com. Enkele van deze aanvullende protocollen zijn door QIAGEN-gebruikers geleverd ten behoeve van QIAGEN-gebruikers. Deze protocollen zijn niet grondig door QIAGEN getest of geoptimaliseerd. QIAGEN garandeert deze protocollen niet en garandeert evenmin dat ze geen rechten van derden schenden.
2. Anders dan uitdrukkelijk gesteld in licenties, garandeert QIAGEN niet dat dit paneel en/of het gebruik ervan geen rechten van derden schenden.
3. Dit paneel en de onderdelen ervan worden in licentie gegeven voor eenmalig gebruik en mogen niet worden hergebruikt, opgeknapt of doorverkocht.
4. QIAGEN doet in het bijzonder afstand van enige andere licenties die worden genoemd of geïmpliceerd, anders dan de uitdrukkelijk gestelde.
5. De koper en gebruiker van het paneel gaan ermee akkoord dat zij geen stappen ondernemen en niemand anders toestaan stappen te ondernemen die tot bovenstaande verboden handelingen kunnen leiden of deze vergemakkelijken. QIAGEN mag de verbodsbepalingen in deze Beperkte licentieovereenkomst afdwingen bij de rechter en zal alle onderzoekskosten en gerechtelijke kosten, inclusief advocaatkosten, verhalen bij elke handeling om deze Beperkte licentieovereenkomst of een intellectueel eigendomsrecht in verband met het paneel en/of de onderdelen ervan af te dwingen.

Zie voor actuele licentievoorwaarden www.qiagen.com.

Feb-17 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, alle rechten voorbehouden.

Bestellen www.qiagen.com/contact | Technische ondersteuning support.qiagen.com | Website www.qiagen.com