

Joulukuu 2017

QIAsymphony[®] SP -protokollalomake

Tissue_LC_200_V7_DSP ja Tissue_HC_200_V7_DSP

Tämä asiakirja on Tissue_LC_200_V7_DSP ja Tissue_HC_200_V7_DSP QIAsymphony SP -protokollalomake, R3, QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -tarvikesarjalle, versio 1.

Yleistä

QIAsymphony DSP DNA -tarvikesarja on tarkoitettu in vitro -diagnostiikkaan.

Nämä protokollat on tarkoitettu kokonais-DNA:n puhdistukseen kudoksista ja formaliiniikiinnitetyistä, parafiinivaletuista (FFPE) kudoksista QIAsymphony SP:n ja QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -tarvikesarjan avulla.

Suosittelimme käyttämään näytetyypin mukaisesti joko matalan pitoisuuden (low content, LC) tai korkean pitoisuuden (high content, HC) protokollaa. Kudoksista saadaan suurempi DNA-sato, kun se käsitellään korkean pitoisuuden protokollalla, mutta matalan pitoisuuden protokollaa voidaan käyttää yhdessä pienen eluaattilavuuden (50 µl) kanssa, jos tarvitaan korkeita DNA-pitoisuuksia. Suosittelemme FFPE-kudoksen käsittelyyn matalan pitoisuuden protokollaa.

Matalan pitoisuuden protokolla

Sarja	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarja (tuotenro 937236)
Näyttemateriaali	FFPE-kudos ja kudos* Yhden valmistelun aikana voidaan käsitellä korkeintaan 4 FFPE -kudospalaa, joiden kunkin paksuus on korkeintaan 10 µm, tai 8 palaa, joiden paksuus on korkeintaan 5 µm ja pinta-ala korkeintaan 250 mm ² .
Protokollan nimi	Tissue_LC_200_V7_DSP
Analyysin kontrollin oletusasetus	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Eluaattilavuus	50 µl, 100 µl, 200 µl tai 400 µl
Tarvittava ohjelmistoversio	Versio 4.0 tai uudempi

* Katso korkean pitoisuuden protokollasta tiedot kudosnäytteistä.

Korkean pitoisuuden protokolla

Sarja	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit -sarja (tuotenro 937236)
Näyttemateriaali	Kudos Jos odotetusta sadosta ei ole tietoa, suosittelemme aloittamaan käyttämällä 25 mg näyttemateriaalia. Näytteen kokoa voidaan suurentaa seuraavissa valmisteluissa jo saadun sadon mukaisesti.
Protokollan nimi	Tissue_HC_200_V7_DSP
Analyysin kontrollin oletusasetus	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Eluaattilavuus	100 µl, 200 µl tai 400 µl
Tarvittava ohjelmistoversio	Versio 4.0 tai uudempi

Tarvittavat materiaalit (jotka eivät kuulu toimitukseen)

Kaikkiin näytetyyppeihin

- Buffer ATL (ATL-puskuri) 4 x 50 ml (tuotenro 939016)
- RNA-sisällön minimointiin: DNAasiton RNAasi A (varastoliuosta 100 mg/ml)

FFPE-kudos (ksyleenin poisto)

- Parafiinipoistoliuos (luettelonro 939018)

FFPE-kudos (parafiinin poisto ksyleenillä)

- Ksyleeni (99–100 %)
- Etanoli (96–100 %)*

Sample (Näyte) -lokero

Näytetyyppi	FFPE-kudos ja kudos
Syötetty näytetilavuus	220 µl (vaaditaan per näyte, per protokolla) [†]
Käsitelty näytetilavuus	200 µl
Ensisijaiset näyteputket	–
Toissijaiset näyteputket	Katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Asettimet	Käytetyn näyteputken mukainen, katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] Matalan ja korkean pitoisuuden protokolliin, järjestelmä ei tunnista, onko näytteen tilavuus alle 220 µl, koska näytteen siirtämisessä ei käytetä nestetason tunnustusta. Varmista siksi, että syötetty näytetilavuus on 220 µl.

n/a = ei olennainen.

Reagents and Consumables (Reagenssit ja tarvikkeet) -lokero

Sijainti A1 ja/tai A2	Reagenssikasetti
Sijainti B1	–
Kärkitelineen pidike 1–17	Kertakäyttöiset suodatinkärjet, 200 tai 1 500 µl
Yksikkölaatikon pidike 1–4	Yksikkölaatikot sisältävät näytteen valmistelukasetit tai 8-sauvaiset kannet

n/a = ei olennainen.

* Älä käytä denaturoitua alkoholia, joka sisältää muita aineita, kuten metanolia tai metyylietyyliketonia.

Waste (Jäte) -lokero

Yksikkölaatikon pidike 1–4	Tyhjät yksikkölaatikot
Jätepussin pidike	Jätepussi
Nestejätepullon pidike	Tyhjä nestejätepullo

Eluate (Eluaatti) -lokero

Eluaattiteline (käytä sijaintia 1, jäähdytysasento)	Katso lisätietoja osoitteesta www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
--	---

Vaaditut muoviasiat

Muoviasiat	Yksi erä, 24 näytettä*	Kaksi erää, 48 näytettä*	Kolme erää, 72 näytettä*	Neljä erää, 96 näytettä*
Kertakäyttöiset suodatinkärjet, 200 µl ^{††}	26	50	74	98
Kertakäyttöiset suodatinkärjet, 1500 µl ^{††}	72	136	200	264
Näytteen valmistelukasetti [§]	21	42	63	84
8-sauvaiset kannet [¶]	3	6	9	12

* Jos erässä käytetään alle 24 näytettä, ajossa tarvitaan vähemmän kertakäyttöisiä suodatinkärkiä.

[†]Suodatinkärkitelineessä on 32 suodatinkärkeä.

^{††}Tarvittavien suodatinkärkien määrä käsittää suodatinkärjet yhteen skannaukseen per reagenssikasetti.

[§]Yksikkölaatikossa on 28 näytteen valmistelukasettia.

[¶]Yksikkölaatikossa on 12 kpl 8-sauvaisia kansia.

Huomautus: Mainittu suodatinkärkien määrä voi poiketa kosketusnäytössä näkyvästä luvusta asetuksista riippuen. Suosittelemme lataamaan suurimman mahdollisen määrän kärkiä.

Eluaattitilavuus

Eluaattitilavuus valitaan kosketusnäytöstä. Eluaattitilavuus voi vaihdella näytetyypin ja DNA-sisällön mukaan korkeintaan 15 µl valittua tilavuutta pienemmäksi. Koska eluaattitilavuus voi vaihdella, suosittelemme tarkistamaan todellisen eluaattitilavuuden, kun käytetään automaattista määrittämisen asetusrjestelmää, joka ei tarkista eluaattitilavuutta ennen siirtoa. Pienillä tilavuuksilla tehty elutio suurentaa lopullisen DNA:n pitoisuutta, mutta samalla pienentää satoa hieman. Suosittelemme käyttämään aiottuun seuraavaan käyttösovellukseen sopivaa eluaattitilavuutta.

Näyttemateriaalin valmistelu

Työskennellessä kemikaalien kanssa on aina käytettävä asianmukaista laboratoriotakkia, kertakäyttökäsineitä ja suojalaseja. Lisätietoja saa tuotekohtaisista käyttöturvallisuustiedotteista (safety data sheets, SDSs), jotka ovat saatavana tuotteen toimittajalta.

Tärkeä huomioitava seikka ennen aloittamista

- QIASymphonyn magneettiset hiukkaset voivat edistää RNA:n ja DNA:n puhdistumista, jos näytteessä on molempia. Minimoi RNA:n määrä näytteessä lisäämällä RNAasi A:ta näytteeseen asianmukaisessa esikäsitelyprotokollassa mainitussa vaiheessa.

Ennen aloittamista suoritettavat valmistelut

- Tarkista ATL-puskuri valkoisten saostumien varalta. Inkuboi tarvittaessa 30 minuutin ajan 37 °C:ssa, liota saostumia ravistelemalla ajoittain.
- Aseta ThermoMixer® tai ravistin-inkubaattori halutun esivalmistelun mukaiseen lämpötilaan.*

Kudokset

DNA-puhdistukseen voi käyttää tuoreita tai jäädytettyjä kudoksia. DNA:n sato ja laatu ovat kudostyyppin, -lähteen ja näytteen säilytysolosuhteiden mukaisia. Tuore kudokse voidaan leikata pieniksi paloiksi ja säilyttää -20 °C:ssa tai -80 °C:ssa ennen käsittelyä. Yleisesti suosittelemme korkean pitoisuuden protokollan käyttöä, sillä se tuottaa suurempia DNA-satoja. Matalan pitoisuuden protokollaa yhdessä 50 µl:n eluaattivilavuuteen suositellaan vain, jos myöhemmissä analyyseissä tarvitaan korkeita DNA-pitoisuuksia. Jos odotetusta sadosta ei ole tietoa, suosittelemme käyttämään korkean pitoisuuden protokollaa, 25 mg näyttemateriaalia ja 200 µl:n eluaattivilavuutta. Seuraavissa valmisteluilla näytteen kokoa voidaan suurentaa tai eluaattivilavuutta pienentää saadun sadon mukaisesti. Huomaa, että valmistelujen liiallinen täyttö pienien eluaattivilavuuksien kanssa voi lisätä magneettisten hiukkasten siirtymistä eluaattiin ja mahdollisesti vaarantaa DNA:n puhtauden ja myöhempien analyysien onnistumisen.

Kudoksen esivalmisteluprotokolla

1. Siirrä kudoksenäyte 2 ml:n mikrosentrifugiputkeen (ei kuulu toimitukseen).
2. Lisää 220 µl ATL-puskuria.
3. Lisää 20 µl proteinaasi K:ta ja sekoita napauttamalla putkea.

* Varmista, että laitteet on tarkastettu, huollettu ja kalibroitu valmistajan ohjeiden mukaan.

Huomautus: Käytä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -tarvikesarjan entsyymitelineen proteinaasi K:ta.

4. Aseta putki ThermoMixer-laitteeseen tai ravistin-inkubaattoriin ja inkuboi 56 °C:ssa ravistaen 900 rpm:n nopeudella, kunnes kudoksesta on lysoitunut täydellisesti.

Huomautus: Lysoitumisaika vaihtelee käsiteltävän kudostyyppin mukaan. Useimmat kudokset lysoituvat kolmessa tunnissa. Jos kolmen tunnin kuluttua lysoituminen ei ole täydellistä, mikä arvioidaan liukenemattoman materiaalin tai erittäin viskoosisen lysaatin esiintymisenä, lysointiä voidaan pidentää tai liukenemattoman materiaalin poistoa sentrifugin avulla vaiheen 6 mukaisesti. Yön yli jatkuva lysointi on mahdollista eikä vaikuta valmisteluun.

5. Minimoi RNA-sisältö näytteessä lisäämällä 4 µl RNAasi A:ta (100 mg/ml) ja inkuboi 2 minuuttia huoneenlämpötilassa (15–25 °C) ennen kuin jatkat vaiheeseen 6.
6. Homogenoi näyte pipetoimalla ylös ja alas useita kertoja.

Huomautus: Jos liukenemattomia materiaaleja on vielä näkyvissä, käytä sentrifugissa 3000 x g:ssa minuutin ajan.

7. Siirrä varovasti 220 µl supernatanttia näyteputkiin, jotka ovat yhteensopivia QIASymphony SP:n näytealustan kanssa.

Katso täydellinen luettelo yhteensopivista näyteputkista osoitteesta

www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Suosittelemme 2 ml:n putkien käyttöä (esim. Sarstedt® tuotenro 72.693 tai 72.608).

FFPE-kudos

Tavallinen formaliiniikiinnitys ja parafiinivalu aiheuttavat aina huomattavaa nukleiinihappojen fragmentoitumista. Jotta DNA fragmentoituisi mahdollisimman vähän, muista nämä:

- Kiinnitä kudoksenäytteen 4–10-prosenttiseen formaliiniin mahdollisimman pian kirurgisen poiston jälkeen.
- Käytä 14–24 tunnin fiksaatioaikaa (pidemmät fiksaatioajat johtavat voimakkaampaan DNA-fragmentaatioon, mistä seuraa myöhempien analyysien huono suorituskyky).
- Kuivata näytteet huolellisesti ennen upottamista parafiiniin (formaliinin jäännökset voivat estää proteinaasi K:n hajoamista).

DNA-puhdistuksen aloitusmateriaalien pitäisi olla juuri leikattuja FFPE-kudospaloja. Yhden valmistelun aikana voidaan käsitellä korkeintaan 4 palaa, joiden kunkin paksuus on korkeintaan 10 µm, tai 8 palaa, joiden paksuus on korkeintaan 5 µm ja pinta-ala korkeintaan 250 mm². Jos aloitusmateriaalista ei ole tietoja, suosittelemme aloittamaan valmistelun korkeintaan 3 palan yhtäaikaista valmistelulla. Seuraavissa valmisteluissa voidaan mahdollisesti käyttää korkeintaan 8 palaa DNA:n sadon ja puhtauden mukaan.

Huomautus: FFPE-kudosprotokollat on suunniteltu erityisesti niin, että niissä puhdistuisi samalla mahdollisimman vähän RNA:ta. Tämä johtaa pienentyneeseen fotometriseen mittausarvoon verrattuna manuaalisen QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue -tarvikesarjan arvoihin.

FFPE-kudoksen esivalmisteluprotokolla

Menetelmä 1: parafiinin poisto parafiininpoistoliuoksella

1. Leikkaa ylimääräinen parafiini näytekappaleesta leikkausveitsellä.
2. Leikkaa erilleen korkeintaan neljä 10 µm paksua palaa, tai korkeintaan kahdeksan 5 µm paksua palaa.

Huomautus: Jos näytteen pinta on altistunut ilmalle, hävitä ensimmäiset 2–3 palaa.

3. Aseta palat välittömästi 2 ml:n Sarstedt-putkeen (ei kuulu toimitukseen, tuotenro 72.693 tai 72.608), joka on yhteensopiva QIASymphony SP:n näytealustan kanssa.
4. Lisää 200 µl ATL-puskuria paloihin.
5. Lisää 20 µl proteinaasi K:ta.

Huomautus: Käytä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -tarvikesarjan entsyymitelineen proteinaasi K:ta.

6. Lisää 160 µl tai 320 µl parafiininpoistoliuosta (katso oheinen taulukko) ja sekoita vortex-laitteessa.

Palojen paksuus	Palojen määrä	Parafiininpoistoliuoksen määrä
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Aseta putki ThermoMixer-laitteeseen tai ravistin-inkubaattoriin ja inkuboi 56 °C:ssa tunti ravistaen 1 000 rpm:n nopeudella, kunnes kudos on lysoitunut täydellisesti.

Huomautus: Lysoitumisaika vaihtelee käsiteltävän kudostyyppin mukaan. Useimmat kudokset lysoituvat tunnissa. Jos tunnin kuluttua lysoituminen ei ole täydellistä, mikä arvioidaan liukenemattoman materiaalin esiintymisenä, lysointiaikaa voidaan pidentää tai liukenematon materiaali voidaan pelletoida sentrifugin avulla vaiheen 10 mukaisesti. Yön yli jatkuva lysointi on mahdollista eikä vaikuta valmisteluun.

8. Inkuboi 90 °C:ssa tunnin ajan.

Huomautus: Inkubointi 90 °C:ssa ATL-puskurissa kääntää formaldehydin muutoksen nukleiinihapoissa osittain päinvastaiseksi. Pidempi inkubointiaika tai korkeammat inkubointilämpötilat voivat aiheuttaa DNA:n suurempaa fragmentoitumista. Jos käytät vain yhtä kuumennuslevyä, jätä näyte huoneenlämpöön 56 °C:ssa inkuboinnin jälkeen, kunnes kuumennuslevy saavuttaa 90 °C:n lämmön.

9. Minimoi RNA-sisältö näytteessä lisäämällä 2 µl RNAasi A:ta (100 mg/ml) alempaan vaiheeseen ja inkuboi 2 minuuttia huoneenlämpötilassa ennen kuin jatkat vaiheeseen 10. Anna näytteen jäähtyä huoneenlämpöön ennen RNAasi A:n lisäämistä.
10. Käytä näytettä sentrifugissa täydellä teholla minuutin ajan huoneenlämmössä.
11. Siirrä putket (joissa on molemmat vaiheet) varovasti QIASymphony SP:n näytealustaan.

Menetelmä 2: parafiinin poisto ksyleenillä

1. Leikkaa ylimääräinen parafiini näytekappaleesta leikkausveitsellä.
2. Leikkaa erilleen korkeintaan neljä 10 µm paksua palaa, tai korkeintaan kahdeksan 5 µm paksua palaa.
Huomautus: Jos näytteen pinta on altistunut ilmalle, hävitä ensimmäiset 2–3 palaa.
3. Aseta palat välittömästi 1,5 tai 2 ml:n mikrosentrifugiputkeen (ei kuulu toimitukseen) ja lisää 1 ml ksyleeniä näytteeseen. Sulje korkki ja sekoita vortex-laitteella kovalla teholla 10 sekunnin ajan.
4. Käytä näytettä sentrifugissa täydellä teholla 2 minuutin ajan huoneenlämmössä.
5. Poista pinnalla kelluva osa pipetoimalla. Älä poista pelletin osia.
6. Lisää 1 ml etanolia (96–100 %) pellettiin ja sekoita vortex-laitteessa.
Huomautus: Etanoli uuttaa ksyleenijäämän näytteestä.
7. Käytä näytettä sentrifugissa täydellä teholla 2 minuutin ajan huoneenlämmössä.
8. Poista pinnalla kelluva osa pipetoimalla. Älä poista pelletin osia.
Huomautus: Poista huolellisesti kaikki jäänyt alkoholi pienellä pipetin kärjellä.
9. Avaa putki ja inkuboi huoneenlämmössä (15–25 °C) 10 minuuttia tai kunnes etanolijäämät ovat haihtuneet.
Huomautus: Inkuboinnin voi tehdä korkeintaan 37 °C:ssa.
10. Suspendoi pelletti uudelleen 220 µl:ssa ATL-puskuria.
11. Lisää 20 µl proteinaasi K:ta ja sekoita vortex-laitteessa.
Huomautus: Käytä QIASymphony DSP DNA Mini Kit -tarvikesarjan entsyymitelineen proteinaasi K:ta.

12. Inkuboi 56 °C:ssa 1 tunnin ajan (tai kunnes näyte on lysoitunut täysin).

Huomautus: Lysoitumisaika vaihtelee käsiteltävän kudostyyppin mukaan. Useimmat kudokset lysoituvat tunnissa. Jos tunnin kuluttua lysoituminen ei ole täydellistä, mikä arvioidaan liukenemattoman materiaalin esiintymisenä, lysointiaikaa voidaan pidentää tai liukenematon materiaali voidaan poistaa sentrifugin avulla vaiheen 16 mukaisesti. Yön yli jatkuva lysointi on mahdollista eikä vaikuta valmisteluun.

13. Inkuboi 90 °C:ssa tunnin ajan.

Huomautus: Inkubointi 90 °C:ssa ATL-puskurissa kääntää formaldehydin muutoksen nukleiinihapoissa osittain päinvastaiseksi. Pidempi inkubointiaika tai korkeammat inkubointilämpötilat voivat aiheuttaa DNA:n suurempaa fragmentoitumista. Jos käytät vain yhtä kuumennuslevyä, jätä näyte huoneenlämpöön 56 °C:ssa inkuboinnin jälkeen, kunnes kuumennuslevy saavuttaa 90 °C:n lämmön.

14. Poista tipat korkin sisäpuolelta käyttämällä näytettä nopeasti sentrifugissa.

15. Minimoi RNA-sisältö näytteessä lisäämällä 2 µl RNAasi A:ta (100 mg/ml) ja inkuboi 2 minuuttia huoneenlämpötilassa, ennen kuin jatkat vaiheeseen 16. Anna näytteen jäähtyä huoneenlämpöön ennen RNAasi A:n lisäämistä.

16. Siirrä varovasti 220 µl lysaattia näyteputkiin, jotka ovat yhteensopivia QIASymphony SP:n näytealustan kanssa.

Huomautus: Jos lysaatit sisältävät sulamatonta materiaalia, käytä niitä sentrifugissa täydellä teholla 2 minuutin ajan huoneenlämmössä, ennen kuin siirät supernatantin näyteputkiin.

Katso täydellinen luettelo yhteensopivista näyteputkista osoitteesta

www.qiagen.com/goto/dsphanbooks. Suosittelemme 2 ml:n putkien käyttöä (esim. Sarstedt, tuotenro 72.693 tai 72.608).

Muutoshistoria

Asiakirjan muutoshistoria	
R3 12/2017	Päivitys QIASymphony-ohjelmistoversiolle 5.0

Voimassa olevat lisenssitiedot ja tuotekohtaiset vastuuvapauslausekkeet ovat saatavilla tuotekohtaisista QIAGEN®-pakkausten käyttöoppaista tai käsikirjoista. QIAGEN-sarjojen käsikirjat ja käyttöoppaat löytyvät osoitteesta www.qiagen.com, tai niitä voi tiedustella QIAGENin teknisestä huollosta tai paikalliselta jälleenmyyjältä.

Tavaramerkit: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAsymphony® (QIAGEN Group); Sarsted® (Sarstedt AG ja Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Tässä asiakirjassa mainittuja rekisteröityjä nimiä, tavaramerkkejä jne. on pidettävä lain suojaamina, vaikkei niitä olisi erityisesti sellaisiksi merkitty.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, kaikki oikeudet pidätetään.

Tilaukset www.qiagen.com/shop | Tekninen tuki support.qiagen.com | Verkkosivusto www.qiagen.com