

# Istruzioni per l'uso (scheda del protocollo) QIAsymphony<sup>®</sup> DSP DNA Mini Kit

Protocolli Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP e Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP protocols

Versione 2

**IVD**

Per uso diagnostico in vitro

Da utilizzare con QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (192)



**REF**

937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1 La scheda del protocollo è disponibile in formato elettronico e si trova nella scheda risorse della pagina del prodotto su [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Informazioni generali

Il QIASymphony DSP DNA Kit è studiato per l'uso diagnostico in vitro.

Questi protocolli sono studiati per la purificazione del DNA totale da tessuti e tessuti FFPE, ossia fissati in formalina e inclusi in paraffina, utilizzando il QIASymphony SP e il QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Si consiglia di utilizzare il protocollo a basso contenuto (LC) o ad alto contenuto (HC) a seconda del tipo di campione. I tessuti producono maggiori rese di DNA se processati con il protocollo ad alto contenuto, ma se è necessaria un'elevata concentrazione di DNA, è possibile utilizzare il protocollo a basso contenuto in combinazione con un ridotto volume di eluizione (50 µl). Per il tessuto FFPE si consiglia di utilizzare il protocollo a basso contenuto.

### Protocollo a basso contenuto

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n. cat. 937236)
<b>Materiale campione</b>	Tessuto FFPE e tessuto* In una preparazione possono essere combinate fino a 4 sezioni di tessuto FFPE, ciascuna con spessore fino a 10 µm, oppure 8 sezioni con spessore fino a 5 µm e superficie fino a 250 mm <sup>2</sup> .
<b>Nome del protocollo</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Set di controllo dell'esame predefinito</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Volume di eluizione</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl o 400 µl
<b>Versione software richiesta</b>	Versione 4.0 o superiore
<b>Configurazione software richiesta per uso IVD</b>	Profilo di default 1

\* Vedere il protocollo ad alto contenuto per informazioni sui campioni di tessuto.

### Protocollo ad alto contenuto

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n. cat. 937236)
<b>Materiale campione</b>	Tessuto Se non sono disponibili informazioni sulla resa prevista, si consiglia di iniziare con 25 mg di materiale campione. A seconda della resa ottenuta è possibile aumentare le dimensioni del campione nelle successive preparazioni.
<b>Nome del protocollo</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Set di controllo dell'esame predefinito</b>	ACS_TissueHLC_200_V7_DSP
<b>Volume di eluizione</b>	50, 100, 200 o 400 µl
<b>Versione software richiesta</b>	Versione 4.0 o superiore
<b>Configurazione software richiesta per uso IVD</b>	Profilo di default 1

## Materiali necessari ma non in dotazione

### Per tutti i tipi di campioni

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (n. cat. 939016)
- Per ridurre al minimo il contenuto di RNA: RNase A priva di DNasi (soluzione madre di 100 mg/ml)

### Per il tessuto FFPE (deparaffinazione senza xilene)

- Deparaffinization Solution (n. cat. 939018)

### Per il tessuto FFPE (deparaffinazione con xilene)

- Xilene (99–100%)
- Etanolo (96–100%)\*

## Cassetto “Sample” (Campione)

<b>Tipo di campione</b>	Tessuto FFPE e tessuto
<b>Volume del campione</b>	220 µl (necessario per campione, per protocollo)*
<b>Volume di campione processato</b>	200 µl
<b>Provette per campioni primarie</b>	n/a
<b>Provette per campioni secondarie</b>	Per ulteriori informazioni, consultare l'elenco dei materiali da laboratorio disponibile nella scheda risorse della pagina del prodotto su <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> .
<b>Inseri</b>	Per ulteriori informazioni, consultare l'elenco dei materiali da laboratorio disponibile nella scheda risorse della pagina del prodotto su <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> .

\* Sia per i protocolli ad alto che a basso contenuto, il sistema non riconosce se il volume del campione è inferiore a 220 µl perché il trasferimento del campione viene eseguito senza il rilevamento del livello del liquido. Occorre pertanto accertarsi che il volume d'ingresso del campione sia 220 µl.

n/a = non applicabile.

## Cassetto “Reagents and Consumables” (Reagenti e materiali di consumo)

<b>Posizione A1 e/o A2</b>	Cartuccia reagenti (RC)
<b>Posizione B1</b>	n/a
<b>Supporto per rack per puntali 1–17</b>	Puntali con filtro monouso, 200 o 1500 µl
<b>Supporto per box unitari 1–4</b>	Box unitari contenenti cartucce per la preparazione dei campioni o 8-Rod Covers

n/a = non applicabile.

\* Non utilizzare alcool denaturato, che contiene sostanze aggiuntive come metanolo o metiletilchetone.

## Cassetto “Waste” (Materiali di scarto)

### Supporto per box unitari 1–4

Box unitari vuoti

### Supporto per sacchetto dei materiali di scarto

Sacchetto dei materiali di scarto

### Supporto per contenitore dei residui liquidi

Contenitore dei residui liquidi vuoto

## Cassetto “Eluate” (Eluito)

Rack per eluizione (si consiglia di utilizzare l’apertura 1, posizione di raffreddamento)

Per ulteriori informazioni, consultare l’elenco del materiale da laboratorio disponibile nella scheda risorse della pagina del prodotto su [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Plastica da laboratorio occorrente

Plastica da laboratorio	Un lotto 24 campioni*	Due lotti 48 campioni*	Tre lotti 72 campioni*	Quattro lotti 96 campioni*
Disposable filter-tips, 200 µl†	26	50	74	98
Disposable filter-tips, 1500 µl†	72	136	200	264
Sample prep cartridges‡	21	42	63	84
8-Rod Covers§	3	6	9	12

\* L’impiego di meno di 24 campioni per lotto riduce il numero di puntali con filtro monouso necessari per ogni processazione.

† Ci sono 32 puntali con filtro su ogni rack per puntali.

‡ La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

§ Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

¶ Ci sono dodici 8-Rod Covers in ogni box unitario.

Nota: il numero di puntali con filtro può variare da quello visualizzato sul touch screen a seconda delle impostazioni. Si consiglia di caricare la massima quantità possibile di puntali.

## Volume di eluizione

Il volume di eluizione viene selezionato sul touch screen. In base al tipo di e al contenuto di DNA, il volume finale può variare di ben 15 µl in meno rispetto al volume selezionato. Poiché il volume dell’eluito può variare, si consiglia di controllare il volume effettivo dell’eluito quando si utilizza un sistema di set di esami automatizzato, che non verifica il volume dell’eluito prima del trasferimento. L’eluizione in volumi inferiori aumenta la concentrazione finale di DNA, ma riduce leggermente la resa. Si consiglia di utilizzare un volume di eluizione adeguato alla prevista applicazione a valle.

## Preparazione dei campioni

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Per raccomandazioni generali relative a prelievo, trasporto e conservazione, fare riferimento alla linea guida approvata dal CLSI MM13-A “Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods”.

## Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Controllare se il Buffer ATL presenta del precipitato bianco. Se necessario, incubare per 30 minuti a 37°C agitando di tanto in tanto per sciogliere il precipitato.
- Impostare un thermomixer o un agitatore/incubatore alla temperatura necessaria per il rispettivo pretrattamento.

## Tessuti

Per la purificazione del DNA possono essere utilizzati tessuti freschi o congelati. La resa e la qualità del DNA ottenuta dipenderanno dal tipo di tessuto, dalla fonte e dalle condizioni di conservazione. Il tessuto fresco può essere tagliato in piccoli pezzi e conservato a -20°C o -80°C prima della processazione. In linea generale, si consiglia di utilizzare il protocollo ad alto contenuto, in quanto consente di ottenere maggiori rese di DNA. Il protocollo a basso contenuto in combinazione con il volume di eluizione di 50 µl è consigliato unicamente se sono necessarie elevate concentrazioni di DNA per l'analisi a valle. In mancanza di informazioni sulla resa prevista, si consiglia di iniziare con un campione di 25 mg utilizzando il protocollo ad alto contenuto e il volume di eluizione di 200 µl. A seconda della resa ottenuta, è possibile aumentare le dimensioni del campione o ridurre il volume di eluizione nelle successive preparazioni. Si noti che sovraccaricando le preparazioni in combinazione con ridotti volumi di eluizione potrebbe verificarsi un carryover di particelle magnetiche nell'eluato, con conseguente compromissione della purezza del DNA e dell'analisi a valle.

**Nota:** quando si lavora con campioni di tessuto congelati, si deve prendere in considerazione la norma ISO 20184-3:2021 (E) per l'estrazione automatica di NA da campioni di tessuto congelati.

**Nota:** la stabilità del campione dipende in larga misura da vari fattori ed è legata alla specifica applicazione a valle. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione a valle utilizzata nel proprio laboratorio e/o convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni di conservazione adeguate.

## Protocollo di pretrattamento per il tessuto

1. Trasferire il campione di tessuto in una provetta per microcentrifuga da 2 ml (non fornita).
2. Aggiungere 220 µl di Buffer ATL.
3. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare picchiettando la provetta.

**Nota:** utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Collocare la provetta in un thermomixer o agitatore/incubatore e incubare a 56°C agitando a 900 giri/min finché il tessuto non è completamente lisato.

**Nota:** il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti, la lisi viene completata entro 3 ore. Se la lisi è incompleta dopo 3 ore, come indicato dalla presenza di materiale insolubile o di lisati altamente viscosi, il tempo di lisi può essere prolungato o il materiale insolubile può essere rimosso mediante centrifugazione come descritto al passaggio 6. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.

5. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 4 µl di RNase A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente (15–25°C) prima di continuare con il passaggio 6.
6. Omogeneizzare il campione aspirandolo e rilasciandolo diverse volte con una pipetta.

**Nota:** se sono ancora presenti pezzi di materiale insolubile, centrifugare a 3000 x g per 1 min.

7. Trasferire con cautela 220 µl del supernatante in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIAasymphony SP.
8. Per un elenco completo delle provette compatibili, consultare l'elenco del materiale da laboratorio su [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt, n. cat. 72.693 o 72.608).

## Tessuto FFPE

Le procedure standard di fissazione in FFPE comportano sempre una significativa frammentazione degli acidi nucleici. Per limitare la portata della frammentazione del DNA accertarsi di:

- fissare i campioni in formalina al 4–10% il più velocemente possibile dopo il prelievo chirurgico
- utilizzare un tempo di fissazione di 14–24 ore (tempi di fissazione più lunghi comportano una più grave frammentazione del DNA con conseguente riduzione delle prestazioni degli esami downstream)
- disidratare accuratamente i campioni prima dell'inclusione in paraffina (la formalina residua può inibire la digestione della proteinasi K)

Il materiale di partenza per la purificazione del DNA deve essere formato da sezioni appena tagliate di tessuto FFPE. In una preparazione possono essere processate fino a 4 sezioni, ciascuna con spessore fino a 10 µm, oppure 8 sezioni con spessore fino a 5 µm e superficie fino a 250 mm<sup>2</sup>. Se non sono disponibili informazioni sulla natura del materiale di partenza, si consiglia di iniziare con non più di 3 sezioni in una singola preparazione. A seconda della resa e della purezza del DNA può essere possibile utilizzare fino a 8 sezioni nelle successive preparazioni.

**Nota:** quando si lavora con tessuti FFPE, si deve prendere in considerazione la norma ISO 20166-3:2018 (E) per l'estrazione automatica di NA da campioni di tessuto FFPE per ulteriori informazioni sulla manipolazione dei campioni.

**Nota:** i protocolli per tessuto FFPE sono studiati appositamente per eseguire esclusivamente la copurificazione di ridotte quantità di RNA. Ciò comporta un valore di misurazione fotometrico ridotto rispetto ai valori ottenuti con il QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit manuale.

### Protocollo di pretrattamento per il tessuto FFPE

Metodo 1: deparaffinazione con Deparaffinization Solution

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocco campione.
2. Tagliare fino a 4 sezioni con spessore di 10 µm oppure fino a 8 sezioni con spessore di 5 µm.  
Nota: se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2–3 sezioni.
3. Collocare immediatamente le sezioni in una provetta Sarstedt da 2 ml (non fornita, n. cat. 72.693 o 72.608) che sia compatibile con il portacampioni del QIASymphony SP.
4. Aggiungere 200 µl di Buffer ATL alle sezioni.
5. Aggiungere 20 µl di proteinasi K.  
Nota: Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. Aggiungere 160 µl o 320 µl di Deparaffinization Solution (vedere tabella seguente) e miscelare su vortex.

Spessore delle sezioni	Numero di sezioni	Volume di Deparaffinization Solution
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Collocare la provetta in un termomiscelatore o agitatore/incubatore e incubare a 56°C per 1 h agitando a 1000 giri/min finché il tessuto non è completamente lisato.  
Nota: il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti, la lisi viene completata entro 1 ora. Se la lisi è incompleta dopo 1 ora, come indicato dalla presenza di materiale insolubile, il tempo di lisi può essere prolungato o il materiale insolubile può essere eliminato mediante centrifugazione, come descritto al passaggio 10. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.
8. Incubare a 90°C per 1 h.  
Nota: l'incubazione a 90°C in Buffer ATL inverte parzialmente la modifica degli acidi nucleici da parte della formaldeide. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA. Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.
9. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 2 µl di RNase A (100 mg/ml) alla fase inferiore e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 10. Lasciar raffreddare il campione a temperatura ambiente prima di aggiungere RNase A.
10. Centrifugare a massima velocità per 1 minuto a temperatura ambiente.
11. Trasferire con cautela le provette (contenenti entrambi le fasi) nel portaprovette per campioni del QIA Symphony SP.

#### Metodo 2: deparaffinizzazione con xilene

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocco campione.
2. Tagliare fino a 4 sezioni con spessore di 10 µm oppure fino a 8 sezioni con spessore di 5 µm.  
Nota: se la superficie del campione è stata esposta all'aria, gettare le prime 2–3 sezioni.
3. Collocare immediatamente le sezioni in una provetta per microcentrifuga da 1,5 o 2 ml (non fornita) e aggiungere 1 ml di xilene al campione. Chiudere il coperchio e agitare vigorosamente su vortex per 10 secondi.
4. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.
5. Rimuovere il surnatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.
6. Aggiungere 1 ml di etanolo (96–100%) al pellet e miscelare su vortex.  
Nota: l'etanolo estrae lo xilene residuo dal campione.
7. Centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente.
8. Rimuovere il surnatante con una pipetta. Non rimuovere in alcun modo il pellet.  
Nota: rimuovere con cautela l'etanolo residuo con un puntale per pipetta sottile.
9. Aprire la provetta e incubare a temperatura ambiente (15–25°C) per 10 minuti o finché tutto l'etanolo residuo non è evaporato.  
Nota: l'incubazione può essere effettuata a temperature fino a 37°C.
10. Risospendere il pellet in 220 µl di Buffer ATL.
11. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare su vortex.  
Nota: utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del QIA Symphony DSP DNA Mini Kit.

12. Incubare a 56°C per 1 h (oppure finché il campione non è completamente lisato).

Nota: il tempo di lisi varia in funzione del tipo di tessuto processato. Per la maggior parte dei tessuti, la lisi viene completata entro 1 ora. Se la lisi è incompleta dopo 1 ora, come indicato dalla presenza di materiale insolubile, il tempo di lisi può essere prolungato o il materiale insolubile può essere rimosso mediante centrifugazione come descritto al passaggio 16. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.

13. Incubare a 90°C per 1 h.

Nota: l'incubazione a 90°C in Buffer ATL inverte parzialmente la modifica degli acidi nucleici da parte della formaldeide. Tempi di incubazione più lunghi o temperature di incubazione più elevate possono comportare una maggiore frammentazione del DNA. Se si utilizza un solo blocco riscaldante, lasciare il campione a temperatura ambiente dopo l'incubazione a 56°C finché il blocco riscaldante non ha raggiunto 90°C.

14. Centrifugare brevemente il campione per eliminare le gocce dall'interno del coperchio.

15. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 2 µl di RNase A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 16. Lasciar raffreddare il campione a temperatura ambiente prima di aggiungere RNase A.

16. Trasferire con cautela 220 µl del lisato in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIAAsymphony SP.

Nota: Se i lisati contengono materiale non digerito, centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente prima di trasferire il supernatante nelle provette per campioni. Per un elenco completo delle provette compatibili, consultare l'elenco del materiale da laboratorio su [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt, n. cat. 72.693 o 72.608).

## Conservazione degli eluiti

Si consiglia di rimuovere la piastra per eluizione dal cassetto "Eluate" (Eluito) subito dopo la conclusione del processo. Le piastre per eluizione possono essere lasciate nel QIAAsymphony SP al termine del processo il giorno seguente (massimo 12 ore, inclusa la durata del processo stesso; condizioni ambientali raccomandate: 18–26°C e umidità relativa del 20–75%). In base alla temperatura e al grado di umidità, l'eluito potrebbe essere esposto a formazione di condensa o evaporazione.

Per la conservazione a breve termine, gli eluiti possono essere conservati a temperatura ambiente per un massimo di 2 settimane. Per la conservazione a lungo termine, si consiglia la conservazione a 2–8°C, -20°C o -80°C.

Nota: la stabilità degli eluiti dipende in larga misura da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione a valle. È stata stabilita per il QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit in relazione ad applicazioni a valle esemplari. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione a valle utilizzata nel proprio laboratorio e/o convalidare l'intero flusso di lavoro per stabilire le condizioni di conservazione adeguate.

## Note importanti prima di iniziare

- Le particelle magnetiche del QIAAsymphony eseguono la procedura di purificazione sia sull'RNA che sul DNA se entrambi sono presenti nel campione. Se è necessario DNA privo di RNA, aggiungere RNase A al campione nella fase indicata nel rispettivo protocollo di pretrattamento.

## Limitazioni e sostanze interferenti

Durante lo sviluppo del QIASymphony DSP DNA Mini Kit, non sono state identificate sostanze interferenti che potessero avere un impatto negativo sulla preparazione del campione.

Nota: i test sono stati eseguiti utilizzando applicazioni a valle esemplari per valutare la qualità degli acidi nucleici estratti. Tuttavia, le diverse applicazioni a valle possono presentare requisiti diversi per quanto riguarda la purezza (cioè l'assenza di potenziali sostanze interferenti), quindi l'identificazione e il test delle sostanze rilevanti devono essere stabiliti come parte dello sviluppo dell'applicazione a valle per qualsiasi flusso di lavoro che coinvolga i QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

## Simboli

Nel presente documento compaiono i seguenti simboli. Per un elenco completo dei simboli utilizzati nelle istruzioni per l'uso o sulla confezione e sull'etichettatura, consultare il manuale.

Simbolo	Definizione del simbolo
	Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Numero di catalogo
Rn	R sta per revisione delle istruzioni per l'uso e n è il numero di revisione
	Produttore

## Cronologia delle revisioni

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	Versione 2, revisione 1 <ul style="list-style-type: none"><li>• Aggiornamento alla versione 2 per la conformità a IVD</li><li>• Aggiunta del paragrafo Limitazioni e sostanze interferenti</li><li>• Aggiunta del paragrafo Conservazione degli eluiti</li><li>• Aggiunta del paragrafo Simboli</li><li>• Aggiornamento del paragrafo Preparazione dei campioni</li></ul>

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per le clausole di esclusione della responsabilità specifiche dei prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN®. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); BD™ (Becton Dickinson and Company); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). I marchi registrati, di fabbrica e così via utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, devono essere considerati come protetti dalla legge.  
06/2022 HB-3029-S07-001© 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.