

Istruzioni per l'uso (Manuale) dell'RNeasy DSP FFPE[®] Kit



Versione 2

IVD

Per uso diagnostico in vitro

Da utilizzare con l'RNeasy DSP FFPE Kit

CE

REF

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Germania

R1 MAT

1127532IT

Contenuto

Uso previsto	4
Utente previsto	4
Descrizione e principio.....	5
Sommario e spiegazioni.....	5
Principi della procedura	6
Materiali in dotazione.....	8
Contenuto del kit	8
Componenti del kit	9
Materiali necessari ma non in dotazione	10
Avvertenze e precauzioni	11
Informazioni sulla sicurezza.....	11
Informazioni di emergenza.....	12
Precauzioni.....	12
Conservazione e manipolazione dei reagenti	14
Stabilità durante l'uso	14
Componenti del kit	14
Procedura	15
Punti importanti prima di iniziare.....	15
Preparazione dei tamponi	16
Operazioni da eseguire prima di iniziare	17
Protocollo: purificazione dell'RNA totale da sezioni di tessuto FFPE.....	18
Controllo di qualità	22

Limitazioni	22
Caratteristiche delle prestazioni.....	23
Smaltimento	24
Guida alla risoluzione dei problemi.....	25
Simboli.....	28
Informazioni di contatto.....	30
Appendice: Note generali per il trattamento dell'RNA	31
Informazioni per gli ordini	34
Cronologia delle revisioni del documento.....	35

Uso previsto

L'RNeasy DSP FFPE Kit è un sistema destinato alla purificazione manuale dell'RNA totale di tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE).

Utilizzare un protocollo ottimizzato basato su colonne spin di silice e includere la rimozione enzimatica del DNA residuo.

L'RNeasy DSP FFPE Kit è destinato all'uso diagnostico in vitro.

Utente previsto

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare.

Descrizione e principio

Sommario e spiegazioni

L'RNaseasy DSP FFPE Kit è stato appositamente studiato per la purificazione dell'RNA totale di sezioni di tessuto fissate in formalina e incluse in paraffina (Formalin-Fixed, Paraffin Embedded, FFPE). Isolando molecole di RNA più lunghe di 70 nucleotidi, il kit consente di recuperare frammenti di RNA utilizzabili per applicazioni come la RT-PCR.

A causa delle condizioni di fissazione e inclusione, gli acidi nucleici dei campioni FFPE sono solitamente frammentati e modificati chimicamente dalla formaldeide. Pertanto, gli acidi nucleici isolati da campioni FFPE hanno spesso un peso molecolare inferiore rispetto a quelli ottenuti da campioni freschi o congelati. Il grado di frammentazione dipende dal tipo e dall'età del campione e dalle condizioni di fissazione, inclusione e conservazione del campione. Per la standardizzazione dei processi di pre-esame dei tessuti FFPE, si consiglia di procedere secondo la norma ISO 20166-1:2018 "Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination processes for formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue - Part 1: Isolated RNA".

Sebbene la modifica della formaldeide non possa essere rilevata negli esami standard di controllo della qualità, come l'elettroforesi su gel o l'analisi lab-on-a-chip, essa interferisce fortemente con le analisi enzimatiche.

Anche se l'RNaseasy DSP FFPE Kit è ottimizzato per invertire il più possibile la modifica della formaldeide senza ulteriore degradazione dell'RNA, gli acidi nucleici purificati di campioni FFPE non devono essere utilizzati in applicazioni a valle che richiedono un RNA completo. Alcune applicazioni possono richiedere modifiche per consentire l'uso di RNA frammentato (ad esempio, la progettazione di piccoli ampliconi per la RT-PCR). Per la sintesi del cDNA, è necessario utilizzare primer casuali o specifici per il gene al posto dei primer oligo-dT.

Anche la colorazione delle sezioni FFPE può compromettere la qualità dell'RNA e le prestazioni nelle applicazioni a valle. Questo vale soprattutto per molti protocolli di colorazione immunohistochimica.

Principi della procedura

La procedura RNeasy DSP FFPE utilizza la consolidata tecnologia RNeasy per la purificazione dell'RNA. Condizioni di lisi appositamente ottimizzate consentono di purificare efficacemente l'RNA totale di sezioni di tessuto FFPE. La fase di digestione della DNasi I rimuove efficacemente la contaminazione da DNA, comprese le molecole altamente frammentate.

Per prima cosa, tutte le sezioni di tessuto FFPE vengono rimosse dalla paraffina trattandole con la Deparaffinization Solution. Successivamente, i campioni vengono incubati in un tampone di lisi ottimizzato, che contiene proteinasi K per rilasciare l'RNA dalle sezioni. Una breve incubazione a una temperatura più elevata inverte parzialmente il legame crociato in formalina degli acidi nucleici rilasciati, migliorando la resa e la qualità dell'RNA e le prestazioni dell'RNA negli esami downstream. Segue un trattamento con DNasi I ottimizzata per eliminare il DNA genomico, compresi i piccolissimi frammenti di DNA spesso presenti nei campioni FFPE dopo una prolungata fissazione con formalina e/o lunghi tempi di conservazione. Successivamente, il lisato viene miscelato con il Buffer RBC. Viene aggiunto etanolo per creare le condizioni di legame appropriate per l'RNA e il campione viene quindi applicato a una RNeasy MinElute Spin Column, dove l'RNA totale si lega alla membrana e i contaminanti vengono lavati via in modo efficiente. L'RNA viene quindi eluito in un minimo di 14 µl di acqua priva di RNasi.

Procedura RNeasy DSP FFPE

Sezioni di tessuto FFPE

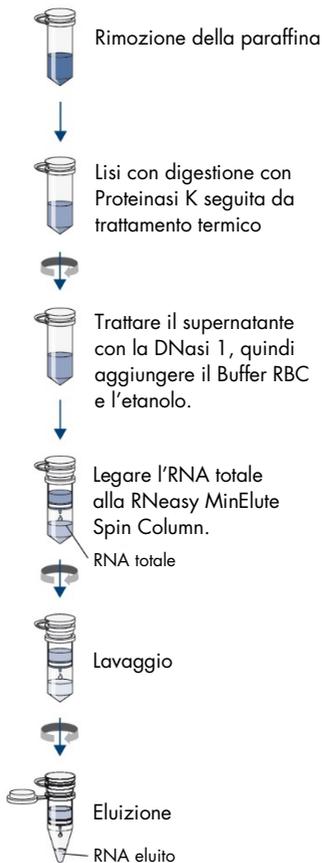


Figura 1. Procedura di purificazione dell'RNA di tessuto FFPE utilizzando l'RNeasy DSP FFPE Kit.

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

RNeasy DSP FFPE Kit	(50)
Numero di catalogo	73604
Numero di preparazioni	50

	Identità	Simboli	Quantità
RNeasy MinElute Spin	RNeasy MinElute® Spin Column (rosa) (ciascuna in una provetta di raccolta da 2 ml)	COL	50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Provette di lavaggio) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (Proteinasi K)	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (DNasi I priva di Rnasi) (liofilizzata)	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (Acqua priva di RNasi)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE† (concentrato)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v2	RNeasy DSP FFPE Kit Handbook (Manuale dell'RNeasy DSP FFPE Kit)		1

* Contiene un sale di guanidina. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag. 11.

† Prima del primo utilizzo, aggiungere 4 volumi di etanolo (96–100%, non denaturato) come indicato sul flacone e descritto a pagina 16 per ottenere una soluzione di lavoro.

Componenti del kit

I principali componenti del kit sono illustrati di seguito.

Tabella 1. Reagenti forniti contenenti principi attivi

Reagente		Componenti	Volume
Simbolo	Nome		
DPS	Deparaffinization Solution	Esadecano	Da $\geq 90\%$ a $\leq 100\%$ p/p
RBC	Buffer RBC	Guanidina cloridrato	$\geq 30\%$ a 70% p/p
PKD	Buffer PKD	Nessuno	–
PK	Proteinase K (Proteinasi K)	Proteinasi K	Da $\geq 1\%$ a $< 3\%$ p/p
DN	RNase-Free DNase I (DNasi I priva di Rnasi) (liofilizzata)	DNasi	Da $\geq 90\%$ a $\leq 100\%$ p/p
RNFW	RNase-Free DNase I (Acqua priva di Rnasi)	Nessuno	–
DBB	DNase Booster Buffer	Nessuno	–
RPE	Buffer RPE (concentrato)	Nessuno	–

Per ridurre al minimo il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici generati dopo l'isolamento dell'RNA, è necessario utilizzare controlli adeguati per le applicazioni a valle.

Materiali necessari ma non in dotazione

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio idoneo, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza, reperibili presso il fornitore.

Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

- Puntali e pipette sterili e privi di RNasi.
- Microcentrifuga (con rotore per provette da 2 ml)
- Agitatore vortex
- Etanolo al 96–100% (non usare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come metanolo o metiletilchetone)
- Guanti monouso
- Blocco riscaldante con funzione di agitazione in grado di incubare a 56°C e 80°C

Avvertenze e precauzioni

Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Tutte le mitigazioni previste sono state implementate, quando possibile, in questa fase di sviluppo del prodotto e sono state sistematicamente riviste. Sulla base della gestione del rischio, il rischio residuo complessivo è ritenuto accettabile e l'uso del dispositivo è considerato sicuro. Non ci sono rischi residui per l'RNeasy DSP FFPE Kit.

Per uso diagnostico in vitro.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il kit.

Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio idoneo, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS in formato PDF sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile reperire, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

AVVERTENZA Rischio di lesioni personali



NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.

I tamponi dell'RNeasy DSP FFPE Kit contengono azoturo di sodio. In caso di fuoriuscita di tamponi del kit, pulire con acqua e detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido fuoriuscito contiene agenti potenzialmente infettivi, pulire l'area interessata con acqua e detergente da laboratorio, quindi con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

Informazioni di emergenza

CHEMTREC

USA e Canada 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada +1 703-527-3887

Precauzioni

Le seguenti indicazioni di pericolo e precauzioni si applicano ai componenti dell'RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNF, DBB

Contiene: azoturo di sodio. Avvertenza! Può essere nocivo se ingerito. In caso di malore, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Deparaffinization Solution



Contiene: esadecano. Pericolo! Può essere fatale se ingerito e penetra nelle vie respiratorie. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Può essere irritante per le vie respiratorie. Può causare effetti dannosi di lunga durata per la vita acquatica. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. NON indurre il vomito. Conservare sotto chiave. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

Proteinase K



Contiene: Proteinasi K. Pericolo! Causa lieve irritazione cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

DNase I



Contiene: DNasi. Pericolo! Può provocare una reazione allergica cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/abbigliamento protettivo/protezione per gli occhi/la faccia. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: Contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

Buffer RBC



Contiene guanidina cloridrato. Avvertenza! Nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

DNase Booster Buffer



Avvertenza! Causa lieve irritazione cutanea. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Le RNase-Free DNase I e RNeasy MinElute spin column devono essere conservate a 2–8°C al momento della consegna. I tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C). In queste condizioni, il kit può essere conservato secondo la data di scadenza riportata sull'etichetta della confezione senza alcuna riduzione delle prestazioni.

Non utilizzare l'RNeasy DSP FFPE Kit una volta scaduto.

Stabilità durante l'uso

Il kit può essere utilizzato per 10 mesi dal primo utilizzo o fino alla data di scadenza.

Componenti del kit

Le date di scadenza dei reagenti sono indicate sull'etichetta dei singoli componenti. Se il prodotto è conservato correttamente, mantiene inalterate le proprie prestazioni per tutto il periodo di stabilità dichiarato, a condizione che i componenti utilizzati appartengano agli stessi lotti.

Per la conservazione a lungo termine della DNase I dopo la ricostituzione, rimuovere la soluzione madre dalla fiala, dividerla in aliquote monouso e conservarla a una temperatura compresa tra -15 e -30°C per un massimo di 10 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C per un massimo di 8 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.

Evitare di esporre i reagenti ai raggi UV (ad esempio quelli utilizzati per la decontaminazione) poiché l'esposizione potrebbe causare un invecchiamento accelerato.

Procedura

Punti importanti prima di iniziare

Materiale di partenza

Le procedure standard di fissazione in formalina e di inclusione in paraffina comportano sempre una significativa frammentazione e legame crociato degli acidi nucleici. Per limitare l'entità della frammentazione e del legame crociato degli acidi nucleici, assicurarsi di:

- utilizzare campioni di tessuto di spessore inferiore a 5 mm per consentire la completa penetrazione della formalina.
- Fissare i campioni di tessuto in formalina a tampone neutro al 4–10% il prima possibile dopo la rimozione chirurgica.
- Utilizzare un tempo di fissazione massimo di 24 ore (tempi di fissazione più lunghi comportano un'eccessiva fissazione e a una frammentazione più grave degli acidi nucleici, con conseguenti scarse prestazioni negli esami downstream).
- Disidratare accuratamente i campioni prima dell'inclusione.
- Utilizzare paraffina a basso punto di fusione per l'inclusione

Il materiale di partenza per la purificazione dell'RNA deve essere costituito da sezioni tagliate di tessuto FFPE, ciascuna con uno spessore massimo di 20 µm. Sezioni più spesse possono determinare una minore resa in acidi nucleici, anche dopo un'incubazione prolungata con proteinasi K. È possibile combinare fino a 4 sezioni, ciascuna con uno spessore massimo di 10 µm, in un unico preparato. È possibile combinare più di 4 sezioni se la somma totale dello spessore delle sezioni è di 40 µm o meno (ad esempio, otto sezioni di 5 µm di spessore).

Per i tessuti con un contenuto di DNA particolarmente elevato si consiglia di utilizzare un numero inferiore di sezioni per ogni preparazione per evitare la contaminazione da DNA dell'RNA purificato.

Se non si hanno informazioni sulla natura del materiale di partenza, si consiglia di iniziare con non più di 2 sezioni per preparato. A seconda della resa e della purezza del RNA può essere possibile utilizzare fino a 4 sezioni nelle successive preparazioni. Tuttavia, un sovraccarico della RNeasy MinElute Spin Column potrebbe ridurre significativamente la resa e la qualità dell'RNA.

Preparazione dei tamponi

Preparazione della soluzione madre di DNasi I

Preparare la soluzione madre di DNasi I sciogliendo la DNasi I liofilizzata in 550 µl di acqua priva di RNasi. Per evitare la perdita di DNasi I, non aprire la fiala. Iniettare l'acqua priva di RNasi nella fiala utilizzando un ago e una siringa privi di RNasi. Miscelare delicatamente capovolgendo la fiala. Non agitare.

In alcuni casi, la fiala di DNasi I può sembrare vuota. Ciò è dovuto al fatto che l'enzima liofilizzato si attacca al setto. Per evitare la perdita di DNasi I, non aprire la fiala. Sciogliere la DNasi I con un ago e una siringa come descritto di seguito.

Nota: la DNasi è particolarmente sensibile alla denaturazione fisica. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la fiala.

Nota: assicurarsi di iniettare l'intero volume di acqua priva di RNasi nella fiala.

Dopo la dissoluzione della DNasi I potrebbe rimanere del materiale insolubile. A causa del processo di produzione, è possibile che nella DNasi I liofilizzata sia presente del materiale insolubile, che non condiziona le prestazioni della DNasi I.

Per la conservazione a lungo termine della DNasi I, rimuovere la soluzione madre dalla fiala, dividerla in aliquote monouso e conservarla a una temperatura compresa tra -15 e -30°C per

un massimo di 10 mesi. Le aliquote scongelate possono essere conservate a 2–8°C per un massimo di 8 settimane. Non ricongelare le aliquote dopo lo scongelamento.

Preparazione del Buffer RPE

Aggiungere 4 volumi (44 ml) di etanolo (96–100%) al flacone contenente 11 ml di Buffer RPE concentrato. Spuntare la casella sull'etichetta per indicare che è stato aggiunto etanolo.

Nota: prima di iniziare la procedura, mescolare il Buffer RPE ricostituito agitando.

Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Se si utilizza l'RNeasy DSP FFPE Kit per la prima volta, consultare "Punti importanti prima di iniziare" (pag. 15).
- Se si opera per la prima volta con l'RNA, leggere "Appendice: Note generali per il trattamento dell'RNA" (pag. 30).
- Il Buffer RBC contiene un sale di guanidina, pertanto non è compatibile con i reagenti disinfettanti a base di candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag. 11.
- Se non diversamente indicato, eseguire tutte le fasi della procedura a temperatura ambiente (15–25°C). Durante la procedura, lavorare con rapidità e senza interruzioni tra un passaggio e l'altro.
- Eseguire tutte le fasi di centrifugazione utilizzando una microcentrifuga a 15–25°C. Se si utilizza una microcentrifuga refrigerata, impostare la temperatura a 20–25°C, altrimenti potrebbe verificarsi un raffreddamento significativo al di sotto dei 15°C.
- Nella procedura riportata di seguito, ▲ indica i volumi da utilizzare se si processano 1–2 sezioni per campione, mentre ● indica i volumi da utilizzare se si processano 3–4 sezioni per campione.
- Se si utilizza il Buffer RPE e la DNasi I priva di RNasi per la prima volta, ricostituirli come descritto in "Preparazione dei tamponi" (pag. 16).

- Equilibrare tutti i tamponi a temperatura ambiente (15–25°C). Mescolare il Buffer RPE ricostituito agitandolo.
- Impostare un miscelatore termico a 56°C per utilizzarlo nei passaggi 5 e 9. Per ridurre i tempi di attesa, impostare un secondo miscelatore termico a 80°C da utilizzare nel passaggio 9.
- Nota: non interrompere la procedura di purificazione a metà in quanto il prolungarsi dei tempi di incubazione potrebbe portare a una perdita o a una degradazione dell'RNA. Il tempo medio di elaborazione di un massimo di 12 campioni in parallelo è di circa 130 minuti.

Protocollo: purificazione dell'RNA totale da sezioni di tessuto FFPE

1. Utilizzando un bisturi, eliminare la paraffina in eccesso dal blocchetto del campione.
2. Tagliare in sezioni dello spessore di 5–20 µm.
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 e chiudere il coperchio.
4. Aggiungere ▲ 160 o ■ 320 µl di Deparaffinization Solution, agitare vigorosamente per 10 secondi e centrifugare brevemente per portare il campione sul fondo della provetta.
5. Incubare a 56°C per 3 minuti e lasciare raffreddare per 5 minuti a temperatura ambiente.
Se si utilizza una quantità insufficiente di Deparaffinization Solution o se si trasporta troppa paraffina con il campione, la Deparaffinization Solution potrebbe diventare cerosa o solida dopo il raffreddamento. In tal caso, aggiungere altra soluzione a intervalli di 160 µl e ripetere il passaggio 5.
6. Aggiungere ▲ 150 o ● 240 µl di Buffer PKD e miscelare agitando in vortex per 3 s.
7. Centrifugare per 1 minuto a 11.000 x g.
8. Aggiungere 10 µl di proteinasi K alla fase inferiore e trasparente e miscelare pipettando delicatamente 10 volte su e giù (non mescolare le fasi separate).

9. Incubare a 56°C per 15 minuti a 1100 rpm, quindi a 80°C per 15 minuti a 1100 rpm.

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 80°C.

Nota: la digestione completa del tessuto con la proteinasi K non è necessaria per ottenere la massima resa di RNA; tuttavia, la fase di incubazione a 80°C è fondamentale.

Importante: assicurarsi che il blocco di riscaldamento abbia raggiunto gli 80°C prima di iniziare l'incubazione di 15 minuti. L'incubazione di 15 minuti a 80°C è fondamentale per l'inversione dei legami di formaldeide e per ottenere prestazioni ottimali dell'RNA nelle applicazioni a valle, come la RT-PCR in tempo reale.

10. Centrifugare brevemente e trasferire ▲ 145 o ● 230 µl della fase inferiore non colorata in una nuova provetta per microcentrifuga da 1,5 ml.

11. Incubare con ghiaccio per 3 minuti. Quindi, centrifugare per 15 minuti a 20.000 x g.

12. Trasferire il supernatante in una nuova provetta per microcentrifuga da 2 ml facendo attenzione a non disturbare il pellet.

Il pellet contiene detriti di tessuto insolubili, tra cui il DNA reticolato.

13. Aggiungere il tampone DNase Booster Buffer equivalente a un decimo del volume totale del campione (▲ 14,5 o ● 23 µl) e 10 µl di soluzione madre di DNasi I. Miscelare capovolgendo la provetta. Centrifugare brevemente per raccogliere il liquido residuo dai lati della provetta.

Nota: la DNasi I viene fornita liofilizzata e deve essere ricostituita come descritto in "Preparazione della soluzione madre di DNasi I", pagina 16.

Nota: la DNasi I è particolarmente sensibile alla denaturazione. Miscelare la soluzione con cautela capovolgendo la provetta. Non agitare.

14. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti.

15. Aggiungere ▲ 320 o ● 500 µl di Buffer RBC per regolare le condizioni di legame e miscelare accuratamente il lisato agitando in vortex per 3 secondi e centrifugando brevemente.

16. Aggiungere ▲ 720 µl o ■ 1200 µl di etanolo (96–100%) al campione. Non centrifugare. Proseguire immediatamente con il passaggio 17.
- Possono essere visibili precipitati dopo l'aggiunta di etanolo. Questo non influisce sulla procedura.
17. Miscelare bene pipettando 5 volte su e giù e trasferire 700 µl del campione, compreso l'eventuale precipitato formatosi, in una RNeasy MinElute Spin Column posta in una provetta di raccolta da 2 ml. Chiudere delicatamente il coperchio e centrifugare per 15 secondi a $\geq 8000 \times g$. Gettare la provetta di raccolta con il flow-through* e inserire la colonna in una nuova provetta di raccolta (in dotazione).
18. Ripetere il passaggio 17 (senza ulteriore miscelazione) fino a quando l'intero campione non è passato attraverso la RNeasy MinElute Spin Column.
19. Aggiungere 500 µl di Buffer RPE alla RNeasy MinElute Spin Column. Chiudere delicatamente il coperchio e centrifugare per 15 secondi a $\geq 8.000 \times g$. Gettare la provetta di raccolta con il flow-through* e inserire la colonna in una nuova provetta di raccolta (in dotazione).
- Nota: il Buffer RPE è fornito come concentrato. Assicurarsi di aggiungere etanolo prima dell'uso come descritto in "Preparazione del Buffer RPE".
20. Aggiungere 500 µl di Buffer RPE alla RNeasy MinElute Spin Column. Chiudere delicatamente il coperchio e centrifugare per 2 minuti a $\geq 8.000 \times g$ per lavare la membrana della colonna spin. Gettare la provetta di raccolta con il flow-through† e inserire la colonna in una nuova provetta di raccolta (in dotazione).
- Nota: dopo la centrifugazione, rimuovere delicatamente la colonnina RNeasy MinElute Spin Column dalla provetta di raccolta, impedendo così alla colonnina di entrare in contatto con il flow-through e di causare il carryover dell'etanolo.

* Il flow-through contiene il Buffer RBC e non è quindi compatibile con la candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag.8.

† Il flow-through contiene il Buffer RBC e non è quindi compatibile con la candeggina. Per le informazioni sulla sicurezza, consultare pag.8.

21. Aprire il coperchio della colonna e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti. Gettare via la provetta di raccolta con il flow-trough.

Per evitare di danneggiare i coperchi, inserire le colonne di centrifugazione nella centrifuga con almeno una posizione vuota tra le colonne. Orientare i coperchi in modo che siano rivolti nel senso opposto alla rotazione del rotore (ad esempio, se il rotore ruota in senso orario, orientare i coperchi in senso antiorario).

È importante asciugare la membrana della colonna di centrifugazione perché l'etanolo residuo potrebbe interferire con le reazioni a valle. La centrifugazione con i coperchi aperti assicura che l'etanolo non venga trasportato durante l'eluizione dell'RNA.

22. Posizionare la RNeasy MinElute Spin Column in una nuova provetta di raccolta da 1,5 ml (in dotazione). Aggiungere 14–32 μ l di acqua priva di RNasi direttamente al centro della membrana della colonnina spin. Chiudere il coperchio delicatamente e centrifugare per 1 minuto alla massima velocità per eluire l'RNA.

L'eluizione con volumi inferiori di acqua priva di RNasi comporta concentrazioni di RNA totale più elevate, ma a rese di RNA inferiori.

Nota: qualora si presuppongano basse rese di RNA, si raccomanda l'uso di una provetta di eluizione Low Bind (non in dotazione). Il volume morto medio della RNeasy MinElute Spin Column è di 2 μ l: l'eluizione con 14 μ l di acqua priva di RNasi produce circa 12 μ l di eluato.

23. Conservare gli eluati di RNA a temperature comprese tra -60 e -90°C o -15 e -30°C per un massimo di 12 settimane.

Nota: la stabilità dell'eluato dipende dal contenuto e dal tipo di RNA isolato, dal volume di eluizione e dalle condizioni di conservazione. Si raccomanda agli utenti di verificare la stabilità degli eluati in base alle proprie esigenze specifiche.

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità certificato ISO di QIAGEN, ogni lotto dell'RNeasy DSP FFPE Kit viene testato in base a specifiche predeterminate per garantire una qualità costante del prodotto.

Limitazioni

Le prestazioni del sistema sono state stabilite in studi di valutazione delle prestazioni per la purificazione di RNA umano da campioni fissati in formalina e inclusi in paraffina.

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia coperta dagli studi di valutazione delle prestazioni QIAGEN.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni a valle.

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Caratteristiche delle prestazioni

Le caratteristiche di prestazione applicabili si trovano nella scheda risorse della pagina dei prodotti su www.qiagen.com.

Smaltimento

I materiali di scarto contengono campioni e reagenti. Tali materiali di scarto possono contenere materiali tossici o infettivi, pertanto devono essere opportunamente smaltiti. Consultare le normative di sicurezza locali per le corrette procedure di smaltimento.

Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS in formato PDF sono disponibili online all'indirizzo www.qiagen.com/safety. Qui è possibile reperire, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Gli esperti dei Servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per i dati di contatto visitare il sito www.qiagen.com).

Commenti e suggerimenti

RNeasy MinElute Spin Column intasata

- | | |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Troppo materiale di partenza | Ridurre la quantità di materiale di partenza. È fondamentale utilizzare la quantità corretta di materiale di partenza (vedere pag. 15). |
| b) Temperatura di centrifugazione troppo bassa | La temperatura di centrifugazione deve essere di 15–25°C. Alcune centrifughe possono raffreddarsi al di sotto dei 15°C anche quando sono impostate a 20°C. Questo può causare la formazione di precipitati che possono intasare la RNeasy MinElute Spin Column. In questo caso, imposta la temperatura di centrifugazione a 25°C. |

Bassa resa dell'RNA

- | | |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Scarsa qualità del materiale di partenza | I campioni fissati per più di 24 ore o conservati per periodi molto lunghi possono contenere pochissimo RNA utilizzabile.
Le sezioni montate su vetrini da microscopio possono produrre poco RNA utilizzabile a causa della prolungata esposizione all'aria. |
| b) Troppo materiale di partenza | Il sovraccarico della RNeasy MinElute Spin Column riduce significativamente le rese di acido nucleico. Ridurre la quantità di materiale di partenza (vedere pag. 15). |
| c) L'RNA è ancora legato alla membrana della RNeasy MinElute Spin Column | Ripetere l'eluizione dell'RNA, ma incubare la RNeasy MinElute Spin Column per 10 minuti con RNFW prima della centrifugazione. |

Commenti e suggerimenti

- d) Errata conservazione dei tamponi/reagenti
- Le RNeasy MinElute Spin Column e la DNasi I devono essere conservate a 2–8°C all'arrivo del kit. Verificare la corretta temperatura di conservazione poiché l'esposizione a temperature più elevate per periodi di tempo più lunghi potrebbe causare la perdita di funzionalità.
-

Basso valore A_{260}/A_{280}

- Acqua utilizzata per diluire l'acido nucleico per la misurazione di A_{260}/A_{280}
- Utilizzare Tris Cl 10 mM, pH 7.5, non acqua, per diluire il campione prima di misurarne la purezza.
-

Contaminazione del DNA negli esperimenti a valle

- a) Troppo materiale di partenza
- Per alcuni tipi di tessuto, l'efficienza della rimozione del DNA può essere ridotta quando si elaborano quantità molto elevate. Se l'RNA eluito contiene una sostanziale contaminazione da DNA, provare a processare meno sezioni di tessuto per ogni preparazione.
- b) Il tessuto ha un elevato contenuto di DNA
- Quando si processano quantità molto elevate di tessuti ricchi di DNA (ad esempio, il fimo), il DNA potrebbe non essere completamente digerito. Ripetere la procedura di purificazione utilizzando meno sezioni di tessuto. Verificare che la DNasi I sia stata conservata correttamente come descritto in "Conservazione e manipolazione dei reagenti" e "Preparazione della soluzione madre di DNasi I".
- c) Trascrizione inversa con una quantità insufficiente di RNA
- La maggior parte delle trascrittasi inverse sono destinate all'uso con circa 1 µg di RNA. Se si esegue la trascrizione inversa con quantità molto ridotte di RNA, si consiglia di utilizzare una trascrittasi inversa appositamente progettata per la trascrizione inversa ad alta sensibilità.
-

L'RNA non funziona bene nelle analisi/applicazioni successive

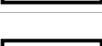
- a) L'RNA si frammenta o si blocca a causa della modifica della formaldeide
- L'incubazione a 80°C nella procedura RNeasy DSP FFPE è fondamentale per ottenere prestazioni ottimali dell'RNA nella trascrizione inversa e in altre applicazioni enzimatiche a valle. Assicurarsi che la temperatura di incubazione sia mantenuta a 80°C per tutti i 15 minuti di incubazione. Sebbene l'incubazione a 80°C rimuova alcune delle modifiche della formaldeide, l'RNA purificato da sezioni FFPE non è un modello ottimale per le reazioni enzimatiche. Si consiglia di utilizzare solo primer casuali o primer specifici per un gene per la sintesi del cDNA. Si consiglia inoltre di mantenere gli ampliconi il più corti possibile per la PCR (<500 nucleotidi).

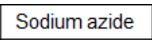
Commenti e suggerimenti

- b) Carryover di etanolo Durante il secondo lavaggio con il Buffer RPE, assicurarsi di centrifugare a $\geq 8000 \times g$ per 2 minuti a 15–25°C per asciugare la membrana della RNeasy MinElute Spin Column. Dopo la centrifugazione, rimuovere delicatamente la colonnina dalla provetta di raccolta, impedendo così alla colonnina di entrare in contatto con il flow-through. Quindi, porre la colonna in una nuova provetta di raccolta e centrifugare alla massima velocità per 5 minuti.
- c) Carryover di sale durante l'eluizione dell'RNA Assicurarsi che il Buffer RPE sia stato ricostituito aggiungendo il volume corretto di etanolo e che il tampone sia a temperatura ambiente (15–25°C).
- d) Trascrizione inversa con una quantità insufficiente di RNA La maggior parte delle trascrittasi inverse sono destinate all'uso con circa 1 µg di RNA. Se si esegue la trascrizione inversa con quantità di RNA molto ridotte, si consiglia di utilizzare una trascrittasi inversa appositamente progettata per la trascrizione inversa ad alta sensibilità.

Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Al momento della consegna
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)
	Componenti (vale a dire un elenco di tutto ciò che è incluso)

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contiene (contenuto)
	Numero (ad esempio fiale, flaconi)
	Codice GTIN (Global Trade Item Number)
Rn	"R" indica la revisione delle Istruzioni per l'uso (manuale) e "n" indica il numero della revisione
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Attenzione
	Proteinasi K
	Azoturo di sodio
	Identificatore univoco del dispositivo

Informazioni di contatto

Per assistenza tecnica e ulteriori informazioni, consultare servizi tecnici QIAGEN all'indirizzo www.qiagen.com/Support, chiamare il numero 00800- 22- 44- 6000, o contattare uno dei reparti di assistenza tecnica QIAGEN o i distributori locali (vedere il retro della copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Appendice: Note generali per il trattamento dell'RNA

Trattamento dell'RNA

Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Poiché le RNasi sono difficili da inattivare e anche minime quantità sono sufficienti a distruggere l'RNA, non utilizzare materiale in plastica o vetro senza aver prima eliminato le possibili contaminazioni da RNasi. Fare molta attenzione a non introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente esente da RNasi, mentre si lavora con l'RNA adottare le seguenti precauzioni durante il pretrattamento e l'uso di recipienti monouso e riutilizzabili e di soluzioni.

Raccomandazioni generali per il trattamento

Quando si lavora con l'RNA è necessario utilizzare tecniche di asepsi microbiologiche appropriate. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono la fonte più comune di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare i guanti frequentemente e chiudere le provette subito dopo l'uso. Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio mentre si pipettano le aliquote per le applicazioni successive.

Per rimuovere la contaminazione da RNasi dalle superfici dei banchi, dalla plastica non monouso e dalle attrezzature di laboratorio (ad esempio, pipette e vasche per l'elettroforesi), si raccomanda l'uso di RNaseZap® (n. cat. AM9780) di Ambion®. In alternativa, la contaminazione da RNasi può essere rimossa utilizzando i normali reagenti da laboratorio. Per decontaminare gli articoli in plastica, risciacquare con NaOH 0,1 M, EDTA 1 mM seguito

da acqua priva di RNasi (vedere “Soluzioni”, pag. 32) o risciacquare con cloroformio se gli articoli in plastica sono resistenti al cloroformio. Per decontaminare le vasche per elettroforesi, pulirle con un detergente (ad esempio, SDS allo 0,5%), risciacquare con acqua priva di RNasi, risciacquare con etanolo (se le vasche sono resistenti all’etanolo) e lasciare asciugare.

Plastica da laboratorio monouso

Si raccomanda l’uso di provette sterili e monouso in polipropilene per tutta la durata della procedura. Queste provette sono generalmente prive di RNasi e non richiedono un pretrattamento per inattivare le RNasi.

Vetreria

La vetreria deve essere trattata prima dell’uso per assicurarsi che sia esente da RNasi. La vetreria utilizzata per la lavorazione dell’RNA deve essere pulita con un detergente, risciacquata accuratamente e tenuta in forno a 240°C per almeno 4 ore (durante la notte, se più conveniente) prima dell’uso. Il solo autoclavaggio non è sufficiente a inattivare del tutto molte RNasi. In alternativa, la vetreria può essere trattata con DEPC (dietilpirocarbonato), come descritto nella sezione “Soluzioni” di seguito.

Soluzioni

Le soluzioni (acqua e altre soluzioni) devono essere trattate con DEPC allo 0,1%. Il DEPC è un inibitore delle RNasi potente, ma non assoluto. Viene comunemente utilizzato a una concentrazione dello 0,1% per inattivare le RNasi su oggetti di vetro o plastica o per creare soluzioni e acqua prive di RNasi. Il DEPC inattiva le RNasi mediante modifica covalente. Aggiungere 0,1 ml di DEPC a 100 ml della soluzione da trattare e agitare vigorosamente per portare la DEPC in soluzione. Lasciare incubare la soluzione per 12 ore a 37°C. Autoclavare per 15 minuti per rimuovere ogni traccia di DEPC. Il DEPC reagisce con le amine primarie e non può essere usato direttamente per trattare i tamponi Tris. Il DEPC è estremamente instabile in presenza di tamponi Tris e si decompone rapidamente in etanolo e CO₂. Quando si preparano i tamponi Tris prima trattare l’acqua con DEPC e poi dissolvere il Tris per ottenere

il tampone del caso. I residui di purine nell'RNA sono modificati per carbossilazione dal DEPC anche in quantità traccia. L'RNA carbossilato si traduce con bassissima efficienza nei sistemi acellulari. Tuttavia la sua capacità di formare ibridi DNA:RNA o RNA:RNA non viene compromessa seriamente a meno che non sia stata modificata una frazione cospicua dei residui di purina. I residui di DEPC devono sempre essere eliminati dalle soluzioni o dai recipienti mediante autoclavaggio o riscaldamento a 100°C per 15 minuti.

Nota: i tamponi RNeasy sono garantiti privi di RNasi senza trattamento con DEPC e sono quindi privi di qualsiasi contaminazione da DEPC.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. cat.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Column, provette di eluizione, provette di lavaggio, provette di lisi, reagenti e tamponi privi di RNasi	73604

Per informazioni aggiornate sulle licenze e sulle esclusioni di responsabilità specifiche del prodotto, vedere il manuale del kit QIAGEN o il manuale dell'utente. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	<p>Aggiornamento alla versione 2 del kit per la conformità a IVDR. Nessuna modifica ai protocolli o alle prestazioni rispetto alla versione 1 del kit.</p> <p>Aggiornamento delle avvertenze e delle precauzioni (aggiunta di rischi residui, informazioni sulle emergenze).</p> <p>Aggiunta della sezione Smaltimento</p>

Contratto di licenza limitata per RNeasy DSP FFPE Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo kit. QIAGEN non concede alcuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
1. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce alcuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
2. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
3. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
4. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (Gruppo QIAGEN); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific o sue consociate). 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-3027-001 1127532IT © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

