

Инструкции за употреба (ръководство) за набор RNeasy[®] DSP FFPE Kit



50

Версия 2

IVD

За инвитро диагностика

За използване с набор RNeasy DSP FFPE Kit



REF

73604



R1 MAT

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Германия

1127532BG

Съдържание

Предназначение	4
Предвиден потребител	4
Описание и принцип	5
Кратко изложение и обяснение	5
Принципи на процедурата	6
Предоставени материали	8
Съдържание на набора	8
Компоненти на набора	9
Необходими, но непредоставени материали	10
Предупреждения и предпазни мерки	11
Информация за безопасността	11
Информация за спешни случаи	12
Предпазни мерки	12
Съхранение и боравене с реактиви	14
Стабилност при употреба	14
Компоненти на набора	14
Процедура	15
Важни моменти преди започване	15
Подготовка на буфери	16
Какво да направите, преди да започнете	17
Протокол: Пречистване на обща РНК от FFPE тъканни срезове	18
Контрол на качеството	23

Ограничения	23
Работни характеристики	24
Изхвърляне	25
Ръководство за отстраняване на проблеми	26
Символи	29
Информация за контакт	31
Приложение: Общи бележки за работа с РНК	32
Информация за поръчка	35
Хронология на редакциите на документа	36

Предназначение

Наборът RNeasy DSP FFPE Kit е система, предназначена за ръчно пречистване на обща РНК от фиксирани с формалин, вградени в парафин (FFPE) тъкани.

Той използва оптимизиран протокол, базиран на центрофугираща колона със силициев диоксид, и включва ензимно отстраняване на остатъчната ДНК.

Наборът RNeasy DSP FFPE Kit е предназначен за инвитро диагностика.

Предвиден потребител

Изделието е предвидено за употреба от професионални потребители – например лаборанти и лекари, обучени в техниките на молекулярната биология.

Описание и принцип

Кратко изложение и обяснение

Наборът RNeasy DSP FFPE Kit е специално проектиран за пречистване на обща РНК от фиксирани с формалин, вградени в парафин (FFPE) тъканни срезове. Чрез изолиране на РНК молекули, по-дълги от 70 нуклеотида, наборът осигурява възстановяване на използваеми РНК фрагменти за приложения като RT-PCR.

Поради условията на фиксиране и вграждане нуклеиновите киселини във FFPE аликвотни части обикновено са фрагментирани и химически модифицирани от формалдехид. Следователно нуклеиновите киселини, изолирани от FFPE аликвотни части, често са с по-ниско молекулно тегло от тези, получени от пресни или замразени проби. Степента на фрагментация зависи от вида и възрастта на аликвотната част и от условията за фиксиране, вграждане и съхранение на пробата. За стандартизиране на процесите на предварително изследване на FFPE тъкани препоръчваме да се процедира в съответствие с ISO 20166-1:2018 „Молекулярно изследване за *in vitro* диагностика. Спецификации за предварителни аналитични процеси за фиксирана във формалин и включена в парафин (formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE) тъкан. Част 1: Изолиране на РНК”.

Въпреки че модификацията във формалдехид не може да бъде открита при стандартни анализи за контрол на качеството, като гел електрофореза или анализ в лабораторно съоръжение, тя силно пречи на ензимните анализи.

Въпреки че наборът RNeasy DSP FFPE Kit е оптимизиран да обърне възможно най-голяма формалдехидна модификация без по-нататъшно разграждане на РНК, нуклеиновите киселини, пречистени от FFPE аликвотни части, не трябва да се използват в приложения надолу по веригата, които изискват пълна дължина на РНК. Някои приложения може да изискват модификации, за да позволят използването на

фрагментирана РНК (напр. проектиране на малки ампликони за RT-PCR). За синтез на кДНК трябва да се използват произволни или ген-специфични праймери вместо олиго-dT праймери.

Оцветяването на FFPE секции може също така да влоши качеството и производителността на РНК при приложения надолу по веригата. Това е особено вярно за много протоколи за имунохистохимично оцветяване

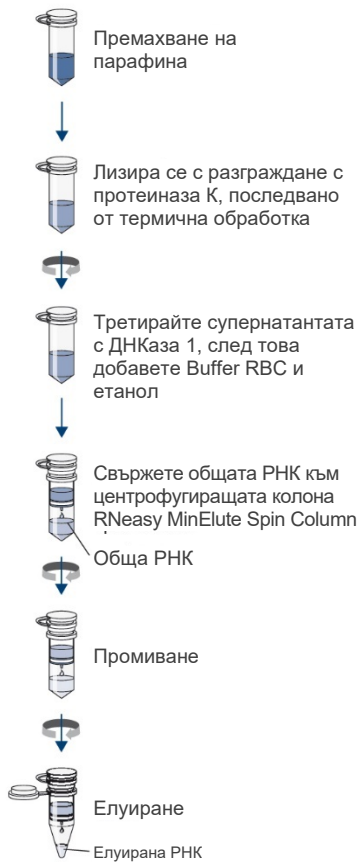
Принципи на процедурата

Процедурата RNeasy DSP FFPE използва утвърдена RNeasy технология за пречистване на РНК. Специално оптимизирани условия на лизиране позволяват общата РНК да бъде ефективно пречистена от FFPE тъканни срезове. Стъпката на разграждане на ДНКаза I ефективно премахва ДНК замърсяването, включително силно фрагментирани молекули.

Първо, целият парафин се отстранява от FFPE тъканните срезове чрез третиране с депарафинизиращ разтвор. След това алиquotните части се инкубират в оптимизиран буфер за лизиране, който съдържа протеиназа К за освобождаване на РНК от секциите. Кратка инкубация при по-висока температура частично обръща формалиновото omрежване на освободените нуклеинови киселини, подобрявайки добива и качеството на РНК, както и ефективността на РНК при ензимни анализи надолу по веригата. Това е последвано от третиране с ДНКаза I, което е оптимизирано за елиминиране на геномна ДНК, включително много малки ДНК фрагменти, които често присъстват в FFPE алиquotните части след продължително фиксиране във формалин и/или дълго време на съхранение. След това лизатът се смесва с буфер Buffer RBC. Добавя се етанол, за да се осигурят подходящи условия за свързване на РНК и след това алиquotната част се нанася върху центрофугираща колона RNeasy MinElute Spin Column, където общата РНК се свързва с мембраната и замърсителите се отмиват ефективно. След това РНК се елуира в минимум 14 µl вода без РНКаза.

Процедура RNeasy DSP FFPE

FFPE тъкани срезове



Фигура 1. Процедура за пречистване на РНК от FFPE тъкан с помощта на набора RNeasy DSP FFPE Kit.

Предоставени материали

Съдържание на набора

Набор RNeasy DSP FFPE Kit		(50)	
Каталожен №		73604	
Брой подготовки		50	
Идентичност		Символи	Количество
RNeasy MinElute Spin (Центрофура RNeasy MinElute)	RNeasy MinElute® Spin Columns (each in a 2 mL Collection Tube) (Центрофугиращи колонки RNeasy MinElute® (всяка в епруветка за вземане от 2 ml))	COL	50
ET	Elution Tubes (Епруветки за елуиране) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Епруветки за лизиране) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Епруветки за промиване) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution (Депарафинизиращ разтвор)	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K (Протеиназа K)	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (lyophilized) (ДНКаза I без РНКаза (лиофилизирана))	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (Вода без РНКаза)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer (ДНКаза бустерен буфер)	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE† (concentrate) (Buffer RPE† (концентрат))	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v2	RNeasy DSP FFPE Kit Handbook (Ръководство за набор RNeasy DSP FFPE Kit)		1

* Съдържа гуанидинова сол. Не е съвместим с дезинфектанти, съдържащи белина. Вижте страница 11 за информация за безопасността.

† Преди да използвате за първи път, добавете 4 обема етанол (96 – 100%, неденатуиран), както е посочено на бутилката и описано на страница 16, за да се получи работния разтвор.

Компоненти на набора

По-долу са обяснени основните компоненти на набора.

Таблица 1. Доставени реактиви, съдържащи активни съставки

Реактив		Компоненти	Обем
Символ	Име		
DPS	Deparaffinization Solution (Депарафинизиращ разтвор)	Хексадекан	≥90% до ≤100% w/w
RBC	Buffer RBC	Гуанидин хидрохлорид	≥30% до 70% w/w
PKD	Buffer PKD	Няма	–
PK	Proteinase K (Протеиназа К)	Proteinase K (Протеиназа К)	≥1% до <3% w/w
DN	RNase-Free DNase I (lyophilized) (ДНКаза I без РНКаза (лиофилизирана))	ДНКаза	≥90% до ≤100% w/w
RNFW	RNase-Free Water (Вода без РНКаза)	Няма	–
DBB	DNase Booster Buffer (ДНКаза бустерен буфер)	Няма	–
RPE	Buffer RPE (концентрат)	Няма	–

За да се сведе до минимум рискът от отрицателно въздействие върху диагностичните резултати, генерирани след изолирането на РНК, трябва да се използват подходящи контроли за последващите приложения по веригата.

Необходими, но непредоставени материали

Когато работите с химикали, винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (ИБЛ), предоставяни от доставчика на продукта.

Уверете се, че апаратите са проверени и калибрирани съгласно препоръките на производителя.

- Стерилни накрайници и пипети без РНКаз
- Микроцентрифуга (с ротор за епруветки от 2 ml)
- Вортекс
- 96 – 100% етанол (не използвайте денатуриран спирт, който съдържа други вещества като метанол или метилетилкетон)
- Ръкавици за еднократна употреба
- Нагревателен блок с функция за разклащане с възможност за инкубиране при 56 °C и 80 °C

Предупреждения и предпазни мерки

Обръщаме ви внимание, че може да се наложи да докладвате на производителя и регулаторния орган в страната по местожителство на потребителя и/или пациента за сериозни инциденти, възникнали във връзка с изделието.

Всички планирани смекчаващи мерки са били приложени, когато това е било възможно на този етап от разработването на продукта, и са били систематично преразглеждани. Въз основа на управлението на риска цялостният остатъчен риск е приемлив и употребата на изделието се счита за безопасна. Няма остатъчни рискове за набора RNeasy DSP FFPE Kit.

За инвитро диагностика.

Прочетете внимателно всички инструкции, преди да използвате набора.

Информация за безопасността

Когато работите с химикали, винаги носете подходяща лабораторна престилка, ръкавици за еднократна употреба и защитни очила. За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Те са достъпни онлайн в PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате информационния лист за безопасност (Safety Data Sheet, SDS) за всеки набор QIAGEN и неговите компоненти.

ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ Опасност от телесни повреди



НЕ наливайте белина или киселинни разтвори директно в отпадъците от подготовката на аликвотните части.

Буферите в набора RNeasy DSP FFPE Kit съдържат натриев азид. Ако се разлят буфери от набора, почистете с подходящ лабораторен почистващ препарат и вода. Ако разлятата течност съдържа потенциално инфекциозни агенти, първо почистете замърсената област с лабораторен почистващ препарат и вода, а след това с 1% (по обем) натриев хипохлорит.

Информация за спешни случаи

CHEMTREC

В САЩ и Канада 1-800-424-9300

Извън САЩ и Канада +1 703-527-3887

Предпазни мерки

Следните предупреждения за опасност и предпазни мерки се отнасят за компонентите на набора RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNFW, DBB

Съдържа: Натриев азид. Предупреждение! Може да бъде вреден при поглъщане. Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар, ако почувствате неразположение.

Deparaffinization Solution (Депарафинизиращ разтвор)



Съдържа: хексадекан. Опасно! Може да бъде фатален при поглъщане и навлизане в дихателните пътища. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Може да предизвика дразнене на дихателните пътища. Може да причини дълготрайни вредни ефекти върху водните организми. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ явна или предполагаема експозиция: Незабавно се обадете в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. НЕ предизвиквайте повръщане. Да се съхранява под ключ. Съдържанието/съдът да се изхвърли в одобрено за целта съоръжение.

**Proteinase K
(Протеиназа К)**



Съдържа: Протеиназа К. Опасно! Предизвиква леко дразнене на кожата. Може да причини алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдишване. Избягвайте вдишване на прах/дим/газ/мъгла/пари/пръски. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. Носете средства за защита на дихателните пътища. ПРИ явна или предполагаема експозиция: Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. Изведете лицето на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането. Съдържанието/съдът да се изхвърли в одобрено за целта съоръжение.

ДНКаза I



Съдържа: ДНКаза. Опасно! Може да причини алергична кожна реакция. Може да причини алергични или астматични симптоми или затруднения в дишането при вдишване. Избягвайте вдишване на прах/дим/газ/мъгла/пари/пръски. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице. Носете средства за защита на дихателните пътища. При явна или предполагаема експозиция: Обадете се в ЦЕНТЪР ПО ТОКСИКОЛОГИЯ или на лекар. Изведете лицето на чист въздух и го поставете в позиция, улесняваща дишането.

Buffer RBC



Съдържа: гуанидин хидрохлорид. Предупреждение! Вреден при поглъщане или вдишване. Предизвиква дразнене на кожата. Предизвиква сериозно дразнене на очите. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

**DNase Booster Buffer
(ДНКаза бустерен
буфер)**



Предупреждение! Предизвиква леко дразнене на кожата. Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/предпазни очила/предпазна маска за лице.

Съхранение и боравене с реактиви

ДНКаза I без РНКаза и центрофугиращите колони RNeasy MinElute Spin Column трябва да се съхраняват при 2 – 8 °С веднага след пристигането им. Буферите може да се съхраняват при стайна температура (15 – 25 °С). При тези условия наборът може да се съхранява, както е посочено в срока на годност на етикета на кутията, без никакво влошаване на производителността.

Не използвайте набора RNeasy DSP FFPE Kit след изтичане на срока му на годност.

Стабилност при употреба

Наборът може да се използва 10 месеца след първата употреба или до изтичане на срока на годност.

Компоненти на набора

Сроковете на годност за всеки реактив са посочени върху индивидуалните етикети на компонентите. При правилни условия на съхранение продуктът ще поддържа производителност за времето на стабилност, докато се използват едни и същи партии от компоненти.

За дългосрочно съхранение на ДНКаза I след разтваряне извадете основния разтвор от флакона, разделете го на аликвоти за еднократна употреба и съхранявайте при -15 до -30 °С до 10 месеца. Размразените аликвоти може да се съхраняват при 2 – 8 °С до 8 седмици. Не замразявайте отново аликвотите след размразяване.

Излагането на реактивите на ултравиолетова светлина (напр. за деконтаминация) трябва да се избягва, защото може да ускори стареенето.

Процедура

Важни моменти преди започване

Изходен материал

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

- Използвайте тъканни аликвотни части с дебелина под 5 mm, за да позволите пълното проникване на формалина
- Фиксирайте тъканните аликвотни части в 4 – 10% неутрално буфериран формалин възможно най-бързо след хирургичното им отстраняване
- Използвайте максимално време за фиксиране от 24 часа (по-дългите времена за фиксиране водят до прекомерно фиксиране и по-сериозна фрагментация на нуклеиновата киселина, което води до лоша производителност при анализите надолу по веригата)
- Напълно да дехидратирате аликвотните части преди вграждане
- Използвайте нискотопим парафин за вграждане

Изходният материал за пречистване на РНК трябва да бъде нарязани участъци от FFPE тъкан, всеки с дебелина до 20 μm . По-дебелите срезове могат да доведат до по-ниски добиви на нуклеинова киселина, дори след продължителна инкубация с протеиназа K. В един препарат могат да бъдат комбинирани до 4 среза, всеки с дебелина до 10 μm . Могат да се комбинират повече от 4 участъка, ако общата сума на дебелината на участъците е 40 μm или по-малко (напр. осем участъка с дебелина 5 μm).

За тъкани с особено високо съдържание на ДНК препоръчваме да използвате по-малко срезове на препарат, за да избегнете замърсяване с ДНК на пречистената РНК.

Ако няма информация за естеството на изходния материал, препоръчваме да започнете с не повече от 2 участъка за един препарат. В зависимост от добива и чистотата на РНК в следващите препарати е възможно да се използват до 4 участъка. Въпреки това, претоварването на центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column може значително да намали добива и качеството на РНК.

Подготовка на буфери

Приготвяне на основен разтвор на ДНКаза I

Пригответе основния разтвор на ДНКаза I, като разтворите лиофилизираната ДНКаза I в 550 µl вода без РНКаза. За да избегнете загуба на ДНКаза I, не отваряйте флакона. Инжектирайте вода без РНКаза във флакона с помощта на игла и спринцовка без РНКаза. Разбъркайте внимателно, като обърнете флакона. Не разбърквайте на вортекс.

В някои случаи флаконът с ДНКаза I може да изглежда празен. Това се дължи на лиофилизиран ензим, полепнал по преградката. За да избегнете загуба на ДНКаза I, не отваряйте флакона. Вместо това разтворете ДНКаза I с помощта на игла и спринцовка, както е описано по-долу.

Забележка: ДНКаза I е особено чувствителна към физическа денатурация. Смесването трябва да се извършва само чрез внимателно обръщане на флакона.

Забележка: Моля, имайте предвид, че във флакона трябва да се инжектира целият обем вода без РНКаза.

След разтварянето на ДНКаза I може да остане неразтворим материал. Поради производствения процес неразтворимият материал може да присъства в лиофилизираната ДНКаза I. Това не влияе върху работата на ДНКаза I.

За дългосрочно съхранение на ДНКаза I извадете основния разтвор от флакона, разделете го на аликвоти и за еднократна употреба и съхранявайте при -15 до -30 °C до 10 месеца. Размразените аликвоти може да се съхраняват при 2 – 8 °C до 8 седмици. Не замразявайте отново аликвотите след размразяване.

Подготовка на Buffer RPE

Добавете 4 обема (44 ml) етанол (96 – 100%) към бутилката, съдържаща 11 ml концентрат на Buffer RPE. Поставете отметка на етикета на шишето, за да отбележите, че е прибавен етанол.

Забележка: Преди да започнете процедурата, разбъркайте разтворения Buffer RPE чрез разклащане.

Какво да направите, преди да започнете

- Ако използвате набора RNeasy DSP FFPE Kit за първи път, прочетете „Важни моменти преди започване“ (страница 15)
- Ако работите с РНК за първи път, прочетете „Приложение: Общи бележки за работа с РНК“ (страница 31).
- Buffer RBC съдържа гуанидинова сол и следователно не е съвместим с дезинфекционни реактиви, съдържащи белина. Вижте страница 11 за информация за безопасността.
- Освен ако не е указано друго, изпълнете всички стъпки от процедурата при стайна температура (15 – 25 °C). По време на процедурата работете бързо. Не спирайте между стъпките.

- Извършете всички стъпки на центрофугиране, като използвате микроцентрифуга, поставена на 15 – 25 °C. Ако използвате хладилна микроцентрифуга, настройте температурата на 20 – 25 °C, в противен случай може да настъпи значително охлаждане под 15 °C.
- В процедурата по-долу ▲ указва обемите, които да се използват, ако се обработват 1 – 2 участъка на алиquotна част, а ● указва обемите, които да се използват, ако се обработват 3 – 4 участъка на алиquotна част.
- Ако използвате Buffer RPE и ДНКаза I без РНКаза за първи път, трябва ги разтворите, както е описано в „Подготовка на буфери“ (страница 16).
- Темперирайте всички буфери до стайна температура (15 – 25 °C). Смесете разтворения Buffer RPE чрез разклащане.
- Задайте термомиксер на 56 °C, който да използвате в стъпка 5 и стъпка 9. За да намалите времето за изчакване, задайте втори термомиксер на 80 °C, който да използвате в стъпка 9.
- **Забележка:** Не спирайте процедурата за пречистване между стъпките, тъй като увеличеното време на инкубация може да доведе до загуба или разграждане на РНК. Средното време за обработка на до 12 паралелни алиquotни части е приблизително 130 минути.

Протокол: Пречистване на обща РНК от FFPE тъканни срезове

1. С помощта на скалпел отрежете излишния парафин от блока с алиquotни части.
2. Нарежете участъци с дебелина 5 – 20 µm.
Ако повърхността на алиquotната част е изложена на въздух, изхвърлете първите 2 – 3 секции.
3. Незабавно поставете участъците в ▲ 1,5 или ● 2 ml микроцентрифужна епруветка и затворете капака.
4. Добавете ▲ 160 или ■ 320 µl депарафинизиращ разтвор, разбъркайте енергично в продължение на 10 секунди и центрофугирайте за кратко, за да достигне алиquotната част дъното на епруветката.

5. Инкубирайте при 56 °C за 3 минути, след което оставете да се охлади за 5 минути при стайна температура.

Ако се използва твърде малко разтвор за депарафинизация или ако с аликвотната част се пренесе твърде много парафин, разтворът за депарафинизация може да стане восъчен или твърд след охлаждане. Ако това се случи, добавете допълнително депарафинизиращ разтвор на стъпки от 160 µl и повторете стъпка 5.

6. Добавете ▲ 150 или ● 240 µl Buffer PKD и разбъркайте чрез вортекса за 3 сек.
7. Центрофугирайте за 1 минута при 11 000 x g.
8. Добавете 10 µl протеиназа K към долната, бистра фаза и разбъркайте, като пипетирате внимателно 10 пъти нагоре и надолу (не смесвайте разделените фази).
9. Инкубирайте при 56 °C за 15 минути при 1100 rpm, след това при 80°C за 15 минути при 1100 rpm.

При използване на само един нагревателен блок след инкубиране при 56 °C оставете аликвотната част на стайна температура, докато нагревателният блок не достигне 80 °C.

Забележка: Пълното разтваряне на тъкан от протеиназа K не е необходимо за максимален добив на РНК; въпреки това етапът на инкубиране при 80 °C е от решаващо значение.

Важно: Уверете се, че нагревателният блок е достигнал 80 °C, преди да започнете 15-минутната инкубация. 15-минутната инкубация при 80 °C е от решаващо значение за обръщане на формалдехидните омрежвания и оптималната ефективност на РНК в приложения надолу по веригата, като RT-PCR в реално време.

10. Центрофугирайте за кратко и прехвърлете ▲ 145 или ● 230 µl от долната неоцветена фаза в нова микроцентрифужна епруветка от 1,5 ml.
11. Инкубирайте върху лед за 3 минути. След това центрофугирайте за 15 минути при 20 000 x g.

12. Прехвърлете супернатантата в нова микроцентрифужна епруветка от 2 ml, като внимавате да не нарушите утайката.

Утайката съдържа неразтворими тъканни остатъци, включително омрежена ДНК.

13. Добавете ДНКаза бустерен буфер, еквивалентен на една десета от общия обем на аликвотната част (▲ 14,5 или ● 23 µl) и 10 µl основния разтвор на ДНКаза I. Разбъркайте, като обърнете епруветката. Центрофугирайте за кратко, за да съберете остатъчната течност от стените на епруветката.

Забележка: ДНКаза I се доставя лиофилизирана и трябва да се разтвори, както е описано в „Приготвяне на основен разтвор на ДНКаза I“, страница 16.

Забележка: ДНКаза I е особено чувствителна към денатурация. Смесването трябва да се извършва само чрез внимателно обръщане на епруветката. Не разбърквайте на вортекс.

14. Инкубирайте при стайна температура за 15 минути.

15. Добавете ▲ 320 или ● 500 µl Buffer RBC, за да коригирате условията на свързване, и разбъркайте старателно лизата чрез вортекс за 3 секунди и центрофугирайте за кратко.

16. Добавете ▲ 720 µl или ■ 1200 µl етанол (96 – 100%) към пробата. Не центрофугирайте. Преминете незабавно към стъпка 17.

След добавяне на етанол може да се виждат утайки. Това не влияе на процедурата.

17. Разбъркайте добре, като пипетирате 5 пъти нагоре-надолу, и прехвърлете 700 µl от пробата, включително утайката, която може да се е образувала, в центрофугираща колона RNeasy MinElute Spin Column, поставена в епруветки за вземане от 2 ml. Затворете внимателно капака и центрофугирайте за 15 сек. при $\geq 8000 \times g$. Изхвърлете епруветката за вземане с остатъка* и поставете колоната в нова епруветка за вземане (доставена).

* Остатъкът съдържа Buffer RBC и следователно не е съвместим с белина. Вижте страница 8 за информация за безопасността.

18. Повторете стъпка 17 (без допълнително смесване), докато цялата проба не премине през центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column.
19. Добавете 500 µl Buffer RPE към центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column. Затворете внимателно капака и центрофугирайте за 15 сек. при $\geq 8000 \times g$. Изхвърлете епруетката за вземане с остатъка* и поставете колоната в нова епруетка за вземане (доставена).

Забележка: Buffer RPE се доставя като концентрат. Уверете се, че преди употреба е добавен етанол, както е описано в „Приготвяне на Buffer RPE“.

20. Добавете 500 µl Buffer RPE към центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column. Затворете внимателно капака и центрофугирайте за 2 минути при $\geq 8000 \times g$, за да измиете мембраната на центрофугиращата колона. Изхвърлете епруетката за вземане с остатъка* и поставете колоната в нова епруетка за вземане (доставена).

Забележка: След центрофугиране внимателно отстранете центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column от епруетката за вземане така, че колоната да не влиза в контакт с остатъка. В противен случай ще се получи пренасяне на етанол.

21. Отворете капака на центрофугиращата колона и центрофугирайте на пълна скорост за 5 минути. Изхвърлете епруетката за вземане с остатъка.

За да избегнете повреда на капаците им, поставете центрофугиращите колони в центрофугата с поне едно празно място между колоните. Ориентирайте капаците така, че да сочат в посока, обратна на въртенето на ротора (напр. ако роторът се върти по посока на часовниковата стрелка, ориентирайте капаците обратно на часовниковата стрелка).

Важно е да изсушите мембраната на центрофугиращата колона, тъй като остатъчният етанол може да попречи на реакциите надолу по веригата.

Центрофугирането с отворени капаци гарантира, че няма да има пренасяне на етанол по време на елуирането на РНК.

* Остатъкът съдържа Buffer RBC и следователно не е съвместим с белина. Вижте страница 8 за информация за безопасността.

22. Поставете центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column в нова епруветка за вземане от 1,5 ml (доставена). Добавете 14 – 32 µl вода без РНКаза директно към центъра на мембраната на центрофугиращата колона. Затворете внимателно капака и центрофугирайте за 1 минута на пълна скорост, за да елуирате РНК.

Елуирането с по-малки обеми вода без РНКаза води до по-високи общи концентрации на РНК, но по-ниски добиви на РНК.

Забележка: За очаквани ниски добиви на РНК се препоръчва епруветка със слабо свързване за елуиране (не е доставена). Средният мъртъв обем на центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column е 2 µl: елуирането с 14 µl вода без РНКаза води до приблизително 12 µl елуат.

23. Съхранявайте РНК елуатите при -60 до -90 °C или при -15 до -30 °C до 12 седмици.

Забележка: Стабилността на елуата ще зависи от съдържанието и вида на изолираната РНК, обема на елуиране и условията на съхранение. Препоръчваме на потребителите да установят стабилността на елуата, както е необходимо за техните специфични изисквания.

Контрол на качеството

В съответствие със сертифицираната по ISO Система за управление на качеството на QIAGEN всяка производствена партида на набора RNeasy DSP FFPE Kit се тества по предварително определени спецификации, за да се осигури постоянно качество на изделията.

Ограничения

Ефективността на системата е установена в проучвания за оценка на ефективността с пречистване на човешка РНК от фиксирани с формалин, вградени в парафин проби.

Потребителят носи отговорността да валидира работните характеристики на системата за всички процедури в неговата лаборатория, които не са включени в изследванията на работните характеристики на QIAGEN.

Трябва да се използват адекватни контроли за по-нататъшните приложения, за да се сведе до минимум рискът от отрицателно отражение върху диагностичните резултати.

Всички получени диагностични резултати трябва да се интерпретират заедно с другите клинични или лабораторни констатации.

Работни характеристики

Приложимите работни характеристики могат да бъдат намерени в раздела Resources (Ресурси) на страницата с продукти на www.qiagen.com.

Изхвърляне

Отпадъците съдържат аликвотни части и реактиви. Тези отпадъци може да съдържат токсични или инфекциозни материали и трябва да се обезвреждат по подходящ начин. В местните разпоредби за безопасност ще намерите съответните процедури за обезвреждане.

За повече информация вижте съответните информационни листове за безопасност (Safety Data Sheet, SDS). Те са достъпни онлайн в PDF формат на www.qiagen.com/safety, където можете да намерите, прегледате и отпечатате информационния лист за безопасност (Safety Data Sheet, SDS) за всеки набор QIAGEN и неговите компоненти.

Ръководство за отстраняване на проблеми

Това ръководство за отстраняване на проблеми може да бъде полезно за отстраняване на евентуално възникнали проблеми. За повече информация вижте и страницата „Често задавани въпроси“ (Frequently Asked Questions, FAQ) в Центъра ни за техническа поддръжка: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Учените в „Технически услуги“ на QIAGEN винаги с радост ще отговорят на всички Ваши въпроси относно информацията и/или протоколите в това ръководство или относно аликвотните части и технологиите на анализ (за информация за контакти посетете www.qiagen.com).

Коментари и предложения

Запушена центрофугираща колона RNeasy MinElute Spin Column

- | | |
|---|---|
| a) Твърде много изходен материал | Намалете количеството изходен материал. От съществено значение е да използвате правилното количество изходен материал (вижте страница 15). |
| b) Температурата на центрофугиране е твърде ниска | Температурата на центрофугиране трябва да е 15 – 25 °C. Някои центрофуги могат да се охладят до под 15 °C дори когато са настроени на 20 °C. Това може да доведе до образуване на утайки, които може да запушат центрофугиращите колони RNeasy MinElute Spin Column. Ако това се случи, настройте температурата на центрофугиране на 25 °C. |

Нисък добив на РНК

- | | |
|---------------------------------------|---|
| a) Лошо качество на изходния материал | Аликвотните части, които са били фиксирани за повече от 24 часа или са били съхранявани за много дълги периоди, може да съдържат много малко използвана РНК.
Срезове, които са били поставени върху микроскопски предметни стъкла, може да дадат много малко използвана РНК поради продължително излагане на въздух. |
| b) Твърде много изходен материал | Претоварването на центрофугиращите колони RNeasy MinElute Spin Column значително намалява добива на нуклеинова киселина. Намалете количеството изходен материал (вижте страница 15). |

Коментари и предложения

- | | |
|---|---|
| c) РНК все още е свързана към мембраната на центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column | Повторете елуирането на РНК, но инкубирайте центрофугиращата колона RNeasy Min Elute Spin Column върху плота за 10 минути с RNFW преди центрофугиране. |
| d) Неправилно съхранение на буфери/реактиви | Центрофугиращите колони RNeasy MinElute Spin Column, както и ДНКаза I, трябва да се съхраняват при 2 – 8 °C след пристигането на набора. Проверете дали температурата на съхранение е правилна, тъй като излагането на по-високи температури за по-дълги периоди от време може да доведе до нарушаване на функционалността. |

Ниска стойност A_{260}/A_{280}

Вода, използвана за разреждане на нуклеинова киселина за измерване на A_{260}/A_{280}

За разреждането на аликвотната част преди измерване на чистотата трябва да използвате 10 mM Tris Cl, pH 7,5, а не вода.

ДНК замърсяване при експерименти надолу по веригата

- | | |
|---|--|
| a) Твърде много изходен материал | За някои видове тъкани ефективността на отстраняването на ДНК може да бъде намалена при обработка на много големи количества. Ако елуираната РНК съдържа значително ДНК замърсяване, опитайте да обработите по-малко на брой тъканни срезове на препарат. |
| b) Тъканта има високо съдържание на ДНК | Когато се обработват много големи количества тъкани, богати на ДНК (напр. тимус), ДНК може да не се усвои напълно. Повторете процедурата за пречистване, като използвате по-малко срезове тъкан. Проверете дали ДНКаза I е съхранена правилно, както е описано в „Съхранение и боравене с реактиви“ и „Приготвяне на изходен разтвор на ДНКаза I“. |
| c) Обратна транскрипция с недостатъчно количество РНК | Повечето обратни транскриптази са предназначени за използване с приблизително 1 µg РНК. Ако извършвате обратна транскрипция с много малки количества РНК, препоръчваме да използвате обратна транскриптаза, която е специално проектирана за силно чувствителна обратна транскрипция. |

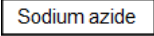
РНК не се представя добре в анализи/приложения надолу по веригата

- a) РНК фрагментирана или блокирана поради формалдехидна модификация
- Инкубацията при 80 °C в процедурата RNeasy DSP FFPE е от решаващо значение за оптималното представяне на РНК при обратната транскрипция и други ензимни приложения надолу по веригата. Уверете се, че температурата на инкубацията се поддържа на 80 °C през цялото време на инкубация от 15 минути.
- Въпреки че инкубацията при 80 °C премахва някои от формалдехидните модификации, пречистената РНК от FFPE секции не е оптимален еталон за ензимни реакции. Препоръчваме да използвате само произволни праймери или ген-специфични праймери за синтез на кДНК. Също така препоръчваме да поддържате ампликоните възможно най-къси за PCR (<500 нуклеотиди).
- b) Пренасяне на етанол
- По време на второто промиване с Buffer RPE трябва да центрофугирате при $\geq 8000 \times g$ за 2 минути при 15 – 25 °C, за да изсушите мембраната на центрофугиращата колона RNeasy MinElute Spin Column. След центрофугиране внимателно отстранете колоната от епруветката за вземане така, че колоната да не влиза в контакт с остатъка. След това поставете колоната в нова епруветка за вземане и центрофугирайте на пълни обороти за 5 минути.
- c) Пренасяне на сол по време на елуирането на РНК
- Уверете се, че Buffer RPE е възстановен чрез добавяне на правилния обем етанол и че буферът е на стайна температура (15 – 25 °C).
- d) Обратна транскрипция с недостатъчно количество РНК
- Повечето обратни транскриптази са предназначени за използване с приблизително 1 μg РНК. Ако извършвате обратна транскрипция с много малки количества РНК, препоръчваме да използвате обратна транскриптаза, която е специално проектирана за силно чувствителна обратна транскрипция.

Символи

Следните символи се фигурират в инструкциите за употреба или на опаковката и етикетите:

Символ	Определение на символа
 Σ	Съдържа достатъчно реактиви за <N> реакции
	Използвайте до
	Този продукт отговаря на изискванията на Европейски регламент 2017/746 за медицински изделия за инвитро диагностика.
	Медицинско изделие за инвитро диагностика
	След получаване
	DN
	RNeasy MinElute Spin (Центрофура RNeasy MinElute)
	Каталожен номер
	Партиден номер
	Номер на материал (т.е. етикет на компонента)
	Компоненти (т. е. списък на това, което е включено)
	Съдържание (съдържанието)

Символ	Определение на символа
	Брой (т. е. флакони, бутилки)
	Глобален номер на търговска единица
Rn	„R“ означава редакция на Инструкциите (ръководството) за употреба, а „n“ е номерът на редакцията
	Ограничение за температура
	Производител
	Направете справка с инструкциите за употреба
	Внимание
	Proteinase K (Протеиназа К)
	Натриев азид
	Уникална идентификация на изделията

Информация за контакт

За техническа помощ и повече информация вижте нашия Център за техническа поддръжка на www.qiagen.com/Support, позвънете на телефон 00800-22-44-6000 или се свържете с един от отделите за техническа поддръжка на QIAGEN или с местен дистрибутор (вижте задната корица или посетете www.qiagen.com).

Приложение: Общи бележки за работа с РНК

Работа с РНК

Рибонуклеазите са много стабилни и активни ензими, които по принцип не изискват кофактори, за да действат. Тъй като рибонуклеазите трудно се инактивират и дори микроскопични количества са достатъчни, за да унищожат РНК, не използвайте пластмасови или стъклени изделия, преди да елиминирате първо евентуалното замърсяване с рибонуклеази. Много трябва да се внимава за избягване на неволното внасяне на РНazi в аликвотната част с РНК по време на процедурата за пречистване или след нея. За да се създаде и поддържа среда без рибонуклеази, следващите предпазни мерки трябва да се вземат по време на предварителната обработка и употребата на съдове и разтвори за еднократна и многократна употреба, когато се работи с РНК.

Обща работа

Когато се работи с РНК, винаги трябва да се използва подходяща микробиологична асептична техника. По ръцете и праховите частици може да има бактерии и плесени и затова те са най-честите източници на замърсяване с рибонуклеази. Винаги носете латексови или винилови ръкавици, когато работите с реактиви и аликвотни части с РНК, за да предотвратите замърсяване с рибонуклеази от повърхността на кожата или от прашно лабораторно оборудване. Сменяйте често ръкавиците и дръжте епруветките затворени, когато е възможно. Съхранявайте пречистената РНК върху лед, когато се пипетират аликвоти за приложения надолу по веригата.

За отстраняване на замърсяване с РНКазa от повърхностите на покривки, пластмасови изделия за еднократна употреба и лабораторно оборудване (напр. пипети и резервоари за електрофореза) препоръчваме да използвате RNaseZap[®] (кат. № AM9780) от Ambion[®]. Алтернативно замърсяването с РНКазa може да се

отстрани с помощта на общи лабораторни реактиви. За да обеззаразите пластмасовите съдове, изплакнете с 0,1 M NaOH, 1 mM EDTA, последвано от вода без РНКаза (вижте "Разтвори", страница 33) или изплакнете с хлороформ, ако пластмасовите изделия са устойчиви на хлороформ. За да обеззаразите резервоарите за електрофореза, почистете с детергент (напр. 0,5% SDS), изплакнете с вода без РНКаза, изплакнете с етанол (ако резервоарите са устойчиви на етанол) и оставете да изсъхнат.

Пластмасови изделия за еднократна употреба

По време на процедурата се препоръчва да се използват стерилни полипропиленови епруветки за еднократна употреба. Тези епруветки обикновено не съдържат РНКази и не изискват предварителна обработка за инактивиране на РНКази.

Стъклени изделия

Стъклените изделия трябва да се обработват против рибонуклеази преди всяка употреба. Стъклените изделия, използвани за работа с РНК, трябва да се измиват с детергент, да се изплакват добре и да се обгарят във фурна при 240 °C за най-малко 4 часа (през нощта, ако е по-удобно) преди употреба. Стерилизация в автоклав сама по себе си не е достатъчна за инактивирането на много рибонуклеази. Стъклените изделия може също така да се обработват с DEPC (диетилпиروкарбонат), както е описано в „Разтвори“ по-долу.

Разтвори

Разтворите (водни и други) трябва да се обработват с 0,1% DEPC. DEPC е силен, но не пълен инхибитор на рибонуклеазите. Той се използва често при концентрация 0,1% за инактивиране на рибонуклеазите върху стъклени или пластмасови изделия или за приготвяне на разтвори и вода без рибонуклеази. DEPC инактивира рибонуклеазите чрез ковалентна модификация. Прибавете 0,1 ml DEPC в 100 ml от разтвора за обработка и разбъркайте силно с разклащане, за да се смеси добре DEPC с разтвора

Оставете разтвора да се инкубира за 12 часа при 37 °C. Стерилизирайте в автоклав 15 минути, за да отстраните изцяло остатъците от DEPC. DEPC реагира с първичните амини и не може да се използва директно за обработка на трис буфери. DEPC е много нестабилен в присъствието на трис буфери и се разгражда бързо на етанол и CO₂. Когато приготвяте трис буфери, обработете първо водата с DEPC и след това разтворете в нея трис (трис(хидроксиметиламино)метан), за да пригответе съответния буфер. Малки количества DEPC модифицират остатъците от пурин в РНК чрез карбетоксиация (въвеждане на етилов естер на карбоксилната киселина). Карбетоксилираната РНК се транслира много неефикасно в безклетъчните системи. Нейната способност да образува хибриди от ДНК:РНК или РНК:РНК обаче не се нарушава значително, ако не е модифицирана голяма част от остатъците от пурин. Остатъчният DEPC винаги трябва да се отстранява от разтвори или съдове със стерилизация в автоклав или нагряване до 100 °C за 15 минути.

Забележка: Буферите в RNeasy са гарантирано без РНКаза, без използване на DEPC обработка и следователно са свободни от каквото и да е DEPC замърсяване.

Информация за поръчка

Изделие	Съдържание	Кат. №
Набор RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 центрофугиращи колони RNeasy MinElute Spin Column, епруветки за елуиране, епруветки за промиване, епруветки за лизиране, реактиви и буфери без RNКаза	73604

За актуална информация за лицензиране и декларации за освобождаване от отговорност за конкретни изделия вижте съответния наръчник или ръководство за потребителя на набора QIAGEN. Наръчниците и ръководствата за потребителя на набори QIAGEN са достъпни на адрес www.qiagen.com или могат да бъдат заявени от отдела за техническо обслужване на QIAGEN или местния Ви дистрибутор.

Хронология на редакциите на документа

Редакция	Описание
R1, юни 2022 г.	Актуализация на версия на набора до версия 2 за съответствие с IVDR. Няма промени в протоколите или работните характеристики в сравнение с набора от версия 1 Актуализация на „Предупреждения и предпазни мерки“ (добавяне на остатъчни рискове, информация за спешни случаи) Добавяне на раздел „Изхвърляне“

Ограничено лицензионно споразумение за набор RNeasy DSP FFPE Kit

Употребата на това изделие означава, че всеки купувач или потребител на изделието приема следните условия:

1. Този продукт може да се използва единствено в съответствие с протоколите, предоставени с продукта и настоящото ръководство, както и само с компонентите, включени в набора. QIAGEN не предоставя лиценз във връзка с никоя от интелектуалните си собствениности за използване или включване на приложените компоненти в този набор с каквито и да са компоненти, които не са включени в него, с изключение на описаните в протоколите, предоставени с продукта, ръководството и допълнителните протоколи, които можете да намерите на www.qiagen.com. Някои от тези допълнителни протоколи са предоставени от потребители на QIAGEN за потребители на QIAGEN. Тези протоколи не са тествани щателно или оптимизирани от QIAGEN. QIAGEN не дава гаранция за тях и не гарантира, че те не нарушават правата на трети страни.
1. Освен изрично посочените лицензи, QIAGEN не дава гаранция, че този набор и/или неговата употреба не нарушават правата на трети страни.
2. Този набор и неговите компоненти са лицензирани за еднократна употреба и не могат да се използват повторно, регенерират или препродават.
3. QIAGEN изрично се освобождава от отговорност за всякакви други лицензи – явни или подразбиращи се – освен изрично посочените.
4. Купувачът и потребителят на набора дават съгласие да не предприемат или позволяват на други лица да предприемат действия, които могат да доведат до или да улеснят някое от действията, забранени по-горе. QIAGEN може да прилага забраните в настоящото Ограничено лицензно споразумение във всеки съд и ще възстанови всички свои разходи за разследване и съдебни разходи, включително адвокатските хонорари, при всяко действие за прилагане на настоящото Ограничено лицензно споразумение или упражняване на всяко от своите права върху интелектуална собственост във връзка с набора и/или неговите компоненти.

За актуалните условия на лиценза вижте www.qiagen.com.

Търговски марки: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific или неговите дъщерни дружества). Регистрираните имена, търговските марки и пр., използвани в настоящия документ, дори ако не са изрично обозначени като такива, не се считат за незащитени от закона.

06/2022 HB-3027-001 1127532 © 2022 QIAGEN, всички права запазени.

