AmoyDx
艾德生物

CE IVD

AmoyDx® FFPE DNA/RNA Kit

(Spin-Säule)

Für die Aufreinigung von DNA und RNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitten

Gebrauchsanweisung

REF 8.02.0002 36 Tests/Kit

Amoy Diagnostics Co., Ltd.
Nr. 39, Dingshan Road, Haicang District,
361027 Xiamen, Volksrepublik China
Tel: +86 592 6806835
Telefax: +86 592 6806839
E-Mail: sales@amoydx.com
Webseite: www.amoydx.com

EC REP **QbD RepS BV**
Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgien

CH REP **Qarad Suisse S.A.**
World Trade Center
Avenue Gratta-Paille 2
1018 Lausanne
Schweiz

Umedwings Netherlands B.V.
Treubstraat 1，2288EG，Rijswijk，
Niederlande
SRN: NL-IM-000000454
Diese Angaben zum Importeur gelten nur für den EU-Markt

Version: V02

Zweckbestimmung

Das AmoyDx® FFPE DNA/RNA Kit verfügt über eine Membran auf Silica-Basis und ein spezielles Lysepuffersystem für die effektive Extraktion von DNA/ RNA aus FFPE-Gewebe. Das Kit wurde speziell für die gleichzeitige Isolierung und Aufreinigung von DNA und RNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten entwickelt. Die aufgereinigte DNA/ RNA eignet sich für Downstream-Anwendungen wie Reverse Transkription, RT-PCR und quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).

Vorgesehener Anwender

Das AmoyDx® FFPE DNA/RNA Kit ist ausschließlich für die Verwendung durch ausgebildetes Laborpersonal bestimmt.

Prinzip

Die Gewebeschnitte der FFPE-Proben werden zunächst mit der Xylol/ Ethanol-Methode entparaffiniert und dann in Puffer RTL und Proteinase K-Lösung inkubiert, um die DNA und RNA aus den Schnitten zu lösen. Nach der Zentrifugierung befindet sich die RNA im Überstand und die DNA in den darunter liegenden Präzipitaten.

DNA-Extraktion: Die Präzipitate werden in Puffer DTL und Proteinase K-Lösung inkubiert, um die DNA vollständig freizusetzen. Eine kurze Inkubation in Puffer DES bei höherer Temperatur kehrt die Formalin-Vernetzung der freigesetzten Nukleinsäuren teilweise um und verbessert so die DNA-Ausbeute und -Qualität sowie die DNA-Performance in nachfolgenden Assays. Das Lysat wird mit Puffer DTB und Ethanol gemischt, um geeignete Bindungsbedingungen für die DNA zu schaffen. Die Mischung wird dann auf eine DNA-Spin-Säule aufgetragen, wo die DNA an die Membran bindet und Verunreinigungen mit Waschpuffer entfernt werden. Die DNA wird in Puffer DTE eluiert.

RNA-Extraktion: Der Überstand wird bei 80 °C inkubiert, um die Formalin-Vernetzung der freigesetzten Nukleinsäuren teilweise umzukehren, was die RNA-Ausbeute und -Qualität sowie die RNA-Performance in nachfolgenden enzymatischen Assays verbessert. Als nächstes wird genomische DNA in der Lösung mittels DNase I entfernt. Das Lysat wird mit Puffer RTB und Ethanol gemischt, um geeignete Bindungsbedingungen für die RNA zu schaffen. Die Probe wird dann auf eine RNA-Spin-Säule aufgetragen, wo die Gesamt-RNA an die Membran bindet und Verunreinigungen mit Waschpuffer entfernt werden. Die Gesamt-RNA wird in Puffer RTE eluiert.

Inhalt des Kits

Dieses Kit enthält genügend Reagenzien, um 36 Tests durchzuführen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Inhalt des Kits

Röhrchen-Nr.	Komponente	Kennzeichnung	Menge
—	**DNA-Spin-Säulen**	DNA Spin Columns DNA 吸附柱	36 Stck. ×1
—	**RNA-Spin-Säulen**	RNA Spin Columns RNA 吸附柱	36 Stck. ×1
—	**Sammelröhrchen (2 mL)**	Collection Tubes (2 mL) 2 mL 收集管	72 Stck. ×2
—	**Zentrifugenröhrchen (1,5 mL)**	Centrifugal Tubes (1.5 mL) 1.5 mL 离心管	72 Stck. ×2
1	**Puffer RTL**	Buffer RTL 裂解液 RTL	10 mL ×1
2	**Proteinase K-Lösung**	Proteinase K Solution 蛋白酶 K 溶液	1,8 mL ×1
3	**DNase I Magic Puffer**	DNase I Magic Buffer DNase I 工作液	1,5 mL ×1
4	**DNase I (30 E/µL)**	DNase I DNA 消化酶	40 µL ×1
5	**Puffer RTB**	Buffer RTB 结合液 RTB	15 mL ×1
6	**Waschpuffer A**	Wash Buffer A 洗涤液 A	13 mL ×1
7	**Waschpuffer B**	Wash Buffer B 洗涤液 B	6 mL ×2

8	**RNA Schutzpuffer**	**RNA Protection Buffer** **RNA 保护液**	200 µL ×1
9	**Puffer RTE**	**Buffer RTE** **洗脱液**	1,5 mL ×3
10	**RNase-freies Wasser**	**RNase-free Water** **无核酸酶水**	1,5 mL ×1
11	**Gewebe-Tracer**	**Tissue Tracer** **沉淀剂**	200 µL ×1
1	**Puffer DTL**	**Buffer DTL** **裂解液 DTL**	10 mL ×1
2	**Puffer DES**	**Buffer DES** **修复液 DES**	900 µL ×1
3	**Puffer DTB**	**Buffer DTB** **结合液 DTB**	10 mL ×1
4	**Puffer DW1**	**Buffer DW1** **洗涤液 DW1**	13 mL ×1
5	**Puffer DW2**	**Buffer DW2** **洗涤液 DW2**	6 mL ×1
6	**Puffer DTE**	**Buffer DTE** **洗脱液 DTE**	8 mL ×1
7	**RNase A (100 mg/mL)**	**RNase A** **RNA 消化酶**	90 µL ×1

Hinweis:

1) ***Puffer RTB***, ***Waschpuffer A***, ***Puffer DTB*** *und* ***Puffer DW1*** *enthalten Guanidinsalz, das nicht in Kontakt mit bleichmittelhaltigen Desinfektionsmitteln oder säurehaltigen Lösungen gebracht werden darf.*
2) *Vor der erstmaligen Verwendung geben Sie 17 mL Ethanol (96~100 %) zu* ***Waschpuffer A****, 24 mL Ethanol (96~100 %) zu* ***Waschpuffer B****, 17 mL Ethanol (96~100 %) zu* ***Puffer DW1*** *und 24 mL Ethanol (96~100 %) zu* ***Puffer DW2.*** *Mischen Sie alle Lösungen gründlich. Kreuzen Sie das Kontrollkästchen auf dem Flaschenetikett an.*
3) *Geben Sie vor der ersten Verwendung 360 µL* ***RNase-freies Wasser*** *zur* ***DNase I (30 U/µL),*** *um eine* ***DNase I (3 U/µL)****-Lösung zu erhalten. Mischen Sie gut, indem Sie vorsichtig auf- und abpipettieren. Lagern Sie die Lösung bei 4 ℃.*

Lagerung und Stabilität

Die Haltbarkeit des Kits beträgt 12 Monate. Das Kit sollte trocken bei Raumtemperatur (10~30 ℃) transportiert und gelagert werden.

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Ausrüstung

1. Ethanol (96~100 %).
2. Xylol.
3. Thermomixer mit Block für 1,5 mL Röhrchen (37~90 ℃ und 500 U/min einstellbar).
4. Mikrozentrifuge (13.000 ×g einstellbar).
5. Vortexer.
6. Handzentrifuge.
7. Verstellbare Pipetten und Nuklease-freie Pipettenspitzen.

Vorsichtsmaßnahmen und Anforderungen an die Handhabung

Vorsichtsmaßnahmen

- Bitte lesen Sie vor der ersten Verwendung die Anleitung sorgfältig durch und machen Sie sich mit allen Komponenten des Kits vertraut. Befolgen Sie während des Gebrauchs strikt die Anweisungen.
- Verwenden Sie das Kit oder einzelne Komponenten des Kits NICHT nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden Sie für die Tests KEINE Reagenzien aus anderen Chargen.

- Verwenden Sie KEINE Reagenzien anderer Testkits.

Sicherheitsinformationen

- **Puffer RTB**, **Waschpuffer A**, **Puffer DTB** und **Puffer DW1** enthalten Guanidinsalz, das in Verbindung mit Bleichmittel hochreaktive Verbindungen bilden kann. **Geben Sie keine Bleichmittel oder säurehaltigen Lösungen direkt in den Probenaufbereitungsabfall.** Wenn die Flüssigkeit, die diesen Puffer enthält, verschüttet wird, reinigen Sie die betroffene Stelle mit einem geeigneten Laborreinigungsmittel und Wasser.

Signalwort	**Warnung**
Gefahrenhinweise:	
H302+H332:	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken oder beim Einatmen.
H315:	Verursacht Hautreizungen.
H319:	Verursacht schwere Augenreizungen.
Sicherheitshinweise	
P261:	Vermeiden Sie das Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol.
P264:	Waschen Sie die Haut nach dem Umgang gründlich.
P301+P312:	BEIM VERSCHLUCKEN: Rufen Sie ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.
P302+P352:	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Waschen Sie sich mit viel Wasser und Seife.
P304+P340+P312:	BEI EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie für eine ungehinderte Atmung.
P305+P351+P388:	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

- Behandeln Sie alle Proben und Komponenten des Kits als potenziell infektiöses Material unter Anwendung sicherer Laborverfahren.
- Verwendung nur durch geschultes Fachpersonal. Bitte tragen Sie beim Umgang mit den Reagenzien einen geeigneten Laborkittel und Einweghandschuhe.
- Wenn ein verschüttetes Produkt potenziell infektiöse Reagenzien enthält, reinigen Sie den betroffenen Bereich zuerst mit Laborreinigungsmittel und Wasser und anschließend mit 1 % (v/v) Natriumhypochlorid oder einem geeigneten Labordesinfektionsmittel.
- Vermeiden Sie den Kontakt von Haut, Augen und Schleimhäuten mit den Chemikalien. Im Falle eines Kontakts spülen Sie sofort mit Wasser.
- NICHT mit dem Mund pipettieren.

Dekontamination und Entsorgung

- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien sollten Sie Handschuhe tragen und diese häufig wechseln, um eine Kontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie beim Umgang mit Proben und Reagenzien separate Pipetten und Nuklease-freie Filterspitzen, um eine Nuklease- und Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Alle Einwegmaterialien sind für den einmaligen Gebrauch bestimmt. BITTE NICHT wiederverwenden.
- Die nicht verwendeten Reagenzien, das gebrauchte Kit und der Abfall müssen ordnungsgemäß entsorgt werden.

Reinigung

- Reinigen Sie nach dem Experiment den Arbeitsbereich und besprühen Sie die Pipetten und Geräte mit 75 %igem Ethanol oder 10 % Natriumhypochlorid.

Probenentnahme, Transport und Lagerung

Standardverfahren zur Formalinfixierung und Paraffineinbettung führen immer zu einer erheblichen Fragmentierung der Nukleinsäuren. Um das Ausmaß der DNA-/ RNA-Fragmentierung zu begrenzen, beachten Sie folgende Empfehlungen:

1) Fixieren Sie die Gewebeproben so schnell wie möglich nach der chirurgischen Entfernung in mindestens dem 10-fachen Volumen einer 10 %igen neutral gepufferten Formalinlösung.
2) Die Gewebedicke, das Volumen des neutral gepufferten Formalins und die Dauer der Fixierung beeinflussen die Qualität der Gewebefixierung. Eine unzureichende Fixierung oder Überfixierung kann zu schlechteren Ergebnissen in nachfolgenden Tests führen. Bei chirurgischen Gewebeproben sollte die Fixierungszeit weniger als 24 Stunden betragen. Bei Biopsie-Proben sollte die Fixierungszeit weniger als 12 Stunden betragen.
3) Verwenden Sie zum Einbetten niedrigschmelzendes Paraffin, da hochschmelzendes Paraffin eine Fragmentierung der Nukleinsäuren verursachen kann.
4) Lagern Sie FFPE-Gewebeproben bei 2~8 °C, da eine langfristige Lagerung bei hoher Temperatur (z.B. Raumtemperatur) den Abbau und die Fragmentierung der Nukleinsäure verstärken kann.
5) Bei der Vorbereitung von FFPE-Gewebeobjektträgern kann es zu Nukleinsäureverlusten kommen. Es wird empfohlen, FFPE-Gewebeblöcke für die DNA-/ RNA-Extraktion direkt in ein Zentrifugenröhrchen zu FFPE-Geweberöllchen zu schneiden.
6) Wenn Sie Objektträger aus FFPE-Gewebe für die DNA-/ RNA-Extraktion verwenden, sollten Sie einen Tropfen Xylol auf die Oberseite

des Objektträgers geben, um das restliche FFPE-Gewebe nach dem Ausschaben aufzulösen, und die Lösung in das Zentrifugenröhrchen pipettieren.

7) Die Lagerzeit von FFPE-Gewebeproben sollte weniger als 3 Jahre betragen.
8) Die Anforderungen an die FFPE-Gewebeproben für die DNA-/ RNA-Extraktion unterscheiden sich je nach FFPE-Gewebetyp (Tabelle 2). Die Menge der FFPE-Gewebeproben wirkt sich direkt auf die DNA-/ RNA-Ausbeute aus.

Tabelle 2 Empfohlene FFPE-Gewebeschnitte für die DNA-/ RNA-Extraktion

Gewebe-Typ	Dicke	Menge
Chirurgische FFPE-Gewebeschnitte	5~8 µm (5 µm wird empfohlen)	4~6 Schnitte (5 Schnittröllchen werden empfohlen)
Biopsie FFPE-Gewebeschnitte	5~8 µm (5 µm wird empfohlen)	8~12 Schnitte (10 Schnittröllchen werden empfohlen)
FFPE-Gewebeobjektträger	/	6~8 Objektträger (7 Objektträger werden empfohlen)

Richtlinien für das Schneiden von Paraffinblöcken

Sie können jede beliebige Methode zum Schneiden der Paraffinblöcke verwenden. Im Folgenden finden Sie allgemeine Richtlinien für das Schneiden von Paraffinblöcken:

1) Vermeiden Sie eine Nuklease-Kontamination, indem Sie eine saubere, scharfe Mikrotomklinge und Pinzette verwenden.
2) Wenn mehrere Proben bearbeitet werden, verwenden Sie für jede Probe eine eigene Mikrotomklinge und Pinzette, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Wenn dies nicht möglich ist, legen Sie die Mikrotomklingen und Pinzetten 2-mal für je 15 Minuten in Xylol oder Terebenthen und tauchen Sie sie anschließend für 1 Minute in Ethanol ein.
3) Wenn Sie mehrere Proben schneiden, Sie das verbleibende Paraffin auf der Mikrotomklinge rechtzeitig mit 75 %iger Ethanol-Lösung.
4) Tragen Sie immer Latex- oder Nitrilhandschuhe.

Assay-Verfahren

1. Entparaffinierung

1.1 Verwenden Sie genügend FFPE-Gewebeschnitte (siehe Tabelle 2) in einem 1,5 mL Zentrifugenröhrchen.

1.2 Geben Sie 1 mL **Xylol** and 2 µL **Gewebe-Tracer** hinzu, schließen Sie den Deckel und vortexen Sie das Röhrchen kräftig für 10 Sekunden. Inkubieren Sie bei 56 ℃ für 3 Minuten und vortexen Sie für 10 Sekunden. Zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Entfernen Sie den Überstand, indem Sie von oben nach unten pipettieren.

Hinweis:

- *Berühren Sie das Präzipitat nicht.*
- *Wenn die Entparaffinierung nicht vollständig ist, wiederholen Sie Schritt 1.2.*

1.3 Geben Sie 1 mL **Ethanol** (96~100 %) und 2 µL **Gewebe-Tracer** zu dem Präzipitat und vortexen Sie das Röhrchen für 10 Sekunden, um das Paraffin aus dem Gewebe zu entfernen. Zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 2 Minuten bei Raumtemperatur. Entfernen Sie den Überstand, indem Sie von oben nach unten pipettieren. (Berühren Sie das Präzipitat nicht).

1.4 Öffnen Sie das Röhrchen und inkubieren Sie das Präzipitat zum Trocknen bei 56 °C für 1~10 Minuten bis das Gewebe eine matte Oberfläche aufweist.

Hinweis: *Vergewissern Sie sich, dass das restliche Ethanol vollständig verdunstet ist, da das Ethanol die RNA-Extraktion beeinträchtigen kann.*

2. Gewebe-Lyse

2.1 Geben Sie 200 µL **Puffer RTL** und 25 µL **Proteinase K-Lösung** in das obige Röhrchen und vortexen Sie vorsichtig. Zentrifugieren Sie kurz und inkubieren Sie es anschließend unter Schütteln (500 U/min) bei 56 ℃ für 30 Minuten im Thermomixer.

2.2 Zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 2 Minuten. Überführen Sie 180 µL des Überstands in ein sauberes 1,5 mL Zentrifugenröhrchen für die RNA-Extraktion.

2.3 Die verbleibende Lösung und das Präzipitat werden für die DNA-Extraktion verwendet. Geben Sie 140 µL **Puffer DTL** und 15 µL **Proteinase K-Lösung** in das Röhrchen und mischen Sie durch Vortexen. Zentrifugieren Sie kurz für 5 Sekunden und inkubieren Sie es unter Schütteln (500 U/min) bei 56 ℃ für 1 Stunde im Thermomixer.

2.4 Führen Sie die RNA-Extraktion während der DNA-Inkubation durch.

3. RNA-Extraktion

Hinweis:

- *Vor der ersten Verwendung geben Sie bitte 17 mL Ethanol (96~100 %) zu **Waschpuffer A**, und 24 mL Ethanol (96~100 %) zu*

***Waschpuffer B**, mischen Sie beides gründlich und markieren Sie es deutlich.*

- *Vor der ersten Verwendung geben Sie bitte 360 µL RNase-freies Wasser zur **DNase I** (30 U/µL), um eine Lösung von 3 U/µL zu erhalten, und mischen Sie gut, indem Sie vorsichtig auf- und abpipettieren. Lagern Sie die Lösung bei 4 ℃.*
- *Überprüfen Sie vor der RNA-Extraktion, dass keine Reagenzien auslaufen. Schütteln Sie die Reagenzien vorsichtig, um die Lösung zu mischen. Wenn die Reagenzien Präzipitate enthalten, lösen Sie diese durch Erhitzen auf 50 ℃ auf.*
- *Es wird empfohlen, die RNA-Extraktion in einer Biosicherheitskabine durchzuführen, um den RNA-Abbau durch RNase in der Laborumgebung zu verhindern.*

3.1 Stellen Sie die Temperatur des Thermomixers auf 80 ℃ ein, inkubieren Sie das Zentrifugenröhrchen mit 180 µL des Überstands unter Schütteln (500 U/Min) bei 80 ℃ für 30 Minuten.

3.2 Nehmen Sie das Zentrifugenröhrchen aus dem Thermomixer und kühlen Sie es auf Raumtemperatur ab. Zentrifugieren Sie es dann kurz für 5 Sekunden.

3.3 Entsprechend dem Verhältnis von 20 µL **DNase I Magic Puffer** und 10 µL **DNase I** (3 U/µL) pro Probe, mischen Sie **DNase I Magic Puffer** und **DNase I** (3 U/µL) durch Auf- und Abpipettieren, um einen DNase I-Master Mix zu erhalten.
***Hinweis:** Der DNase I-Master Mix sollte erst kurz vor der Verwendung zubereitet werden.*

3.4 Geben Sie 30 µL DNase I-Master Mix zu der Probe und mischen Sie vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren. Inkubieren Sie bei 37 ℃ für 15 Minuten im Thermomixer.

3.5 Fügen Sie 340 µL **Puffer RTB** und 750 µL Ethanol (96~100 %) hinzu und mischen Sie vorsichtig durch Vortexen. Zentrifugieren Sie kurz für 5 Sekunden.

3.6 Übertragen Sie 650 µL Lysat auf die RNA-Spin-Säule (in einem 2 mL Sammelröhrchen), ohne den Rand zu benetzen, schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.

3.7 Übertragen Sie die verbleibende Lösung auf die RNA-Spin-Säule, ohne den Rand zu benetzen, schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.

3.8 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer A** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.

3.9 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer B** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.

3.10 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer B** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie die Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.

3.11 Geben Sie die RNA-Spin-Säule in ein sauberes 2 mL Sammelröhrchen und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 3 min. Verwerfen Sie das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.

3.12 Geben Sie die RNA-Spin-Säule in ein sauberes 1,5 mL Zentrifugenröhrchen. Öffnen Sie das Röhrchen und inkubieren Sie es bei 56 °C für 3 Minuten.

3.13 Entsprechend dem Verhältnis von 100 µL **Puffer RTE** und 5 µL **RNA Schutzpuffer** mischen Sie **Puffer RTE** und **RNA Schutzpuffer** durch Auf- und Abpipettieren, um ausreichend **Puffer RTE-Mix** herzustellen.

3.14 Geben Sie 80~100 µL **Puffer RTE-Mix** in die Mitte der Membran. Berühren Sie die Membran nicht. Schließen Sie den Deckel und inkubieren Sie bei 56 ℃ für 2 Minuten. Zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 1 Minute.
Hinweis:

- *Der Puffer RTE-Mix sollte vor der Verwendung zubereitet werden.*
- *Eine zweifache Elution sorgt für eine höhere RNA-Ausbeute. (z.B. Wenn das Elutionsvolumen 100 µL beträgt, geben Sie zunächst 50 µL Puffer RTE-Mix in die Mitte der Membran, inkubieren bei 56 ℃ für 2 Minuten und zentrifugieren bei 13.000 ×g für 1 Minute. Geben Sie dann weitere 50 µL Puffer RTE-Mix auf die Membran, inkubieren Sie bei 56 ℃ für 2 Minuten und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 1 Minute).*

3.15 Die eluierte RNA in dem Zentrifugenröhrchen ist sofort einsatzbereit. Wenn die RNA nicht innerhalb von 2 Stunden verwendet wird, sollte sie bei -70 ℃ gelagert werden.

4. DNA-Extraktion

Hinweis:

- *Vor dem ersten Gebrauch geben Sie bitte 17 mL Ethanol (96~100 %) zu **Puffer DW1**, und 24 mL Ethanol (96~100 %) zu **Puffer DW2**, mischen Sie beides gründlich und markieren Sie es deutlich.*
- *Überprüfen Sie vor der DNA-Extraktion, dass die Reagenzien nicht auslaufen. Schütteln Sie die Reagenzien vorsichtig, um die Lösungen zu mischen. Wenn die Reagenzien Präzipitate enthalten, lösen Sie diese durch Erhitzen auf 50 ℃ auf.*

4.1 Nehmen Sie das Röhrchen aus dem Thermomixer und zentrifugieren Sie es kurz für 5 Sekunden.

4.2 Geben Sie 10 µL **Puffer DES** hinzu, mischen Sie vorsichtig durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz für 5 Sekunden. Dann inkubieren Sie unter Schütteln (500 U/min) bei 90 ℃ für 1 Stunde im Thermomixer.

4.3 Nehmen Sie das Zentrifugenröhrchen aus dem Thermomixer und zentrifugieren Sie es kurz für 5 Sekunden.
Hinweis: *Wenn Sie RNA-freie genomische DNA benötigen, lassen Sie die Probe auf Raumtemperatur abkühlen, fügen Sie 2 µL* ***RNase A (100 mg/mL)*** *hinzu und inkubieren Sie für 5 Minuten bei Raumtemperatur.*

4.4 Geben Sie nacheinander 350 µL **Ethanol** (96~100 %) und 150 µL **Puffer DTB** hinzu, mischen Sie durch Vortexen und zentrifugieren Sie kurz für 5 Sekunden.

4.5 Übertragen Sie das gesamte Lysat auf die DNA-Spin-Säule (in einem 2 mL Sammelröhrchen), ohne den Rand zu benetzen, schließen Sie den Deckel und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.

4.6 Geben Sie 600 µL **Puffer DW1** auf die DNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie den Durchfluss im Sammelröhrchen.

4.7 Geben Sie 600 µL **Puffer DW2** auf die DNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 13.000×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.

4.8 Geben Sie die DNA-Spin-Säule in ein sauberes 2 mL Sammelröhrchen und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 3 Minuten. Verwerfen Sie das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.

4.9 Geben Sie die DNA-Spin-Säule in ein sauberes 1,5 mL Zentrifugenröhrchen. Halten Sie das Röhrchen zum Trocknen bei 56 °C für 3 Minuten geöffnet.

4.10 Geben Sie 30~100 µL **Puffer DTE** in die Mitte der Membran. Berühren Sie die Membran nicht. Inkubieren Sie bei Raumtemperatur für 2 Minuten. Zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 1 Minute.
Hinweis: *Eine zweifache Elution sorgt für eine höhere DNA-Ausbeute. (z.B.: Wenn das Elutionsvolumen 100 µL beträgt, geben Sie zunächst 50 µL Puffer DTE in die Mitte der Membran, inkubieren Sie für 2 Minuten bei 56 ℃ und zentrifugieren Sie für 1 Minute bei 13.000 ×g. Geben Sie dann erneut Puffer DTE in die Mitte der Membran, inkubieren Sie für 2 Minuten bei 56 ℃ und zentrifugieren Sie für 1 Minute lang bei 13.000 ×g.)*

4.11 Die eluierte DNA in dem Zentrifugenröhrchen ist sofort einsatzbereit. Wenn DNA nicht innerhalb von 6 Stunden verwendet wird, sollte sie bei -20 ℃ gelagert werden.

Leistungsmerkmale

Die Extraktionseffizienz des Kits wurde durch Tests an sechs klinischen FFPE-Gewebeproben nachgewiesen.

- Extrahierte DNA: Mittlere Absorption bei 260 (A260) ≥ 0,2, und mittleres Verhältnis A260/A280 ≥ 1,6.
- Extrahierte RNA: Mittlere Absorption bei 260 (A260) ≥ 0,25, und mittleres Verhältnis A260/A280 ≥ 1,6.

Beschränkungen

1) Die Qualität der extrahierten DNA und RNA unterliegt dem Einfluss von Faktoren wie Probenquelle, Entnahmeverfahren, Formalinfixierung, Paraffineinbettung und Lagerbedingungen.
2) Die Qualität der Probe hat einen großen Einfluss auf die Qualität und Menge der gereinigten DNA/ RNA.
3) Aufgrund der Fixierungs- und Einbettungsbedingungen sind die Nukleinsäuren in FFPE-Gewebeproben in der Regel stark fragmentiert und durch Formaldehyd chemisch verändert. Die aus FFPE-Gewebe extrahierte DNA/ RNA sollte nicht für Downstream-Anwendungen verwendet werden, die DNA/ RNA in voller Länge benötigen.

Allgemeine Hinweise

Sollte es bei der Verwendung dieses Kits oder als Folge davon zu einem schwerwiegenden Zwischenfall gekommen sein, melden Sie dies bitte dem Hersteller und Ihrer nationalen Behörde.

Referenzen

Chevillard S. A method for sequential extraction of RNA and DNA from the same sample, specially designed for a limited supply of biological material. *Biotechniques.* 1993 Jul;15(1):22-4

Symbole

EC REP	Bevollmächtigter Vertreter in der Europäischen Gemeinschaft/Europäischen Union	IVD	In-vitro-Diagnostikum
	Hersteller	REF	Katalognummer
LOT	Chargennummer		Haltbarkeitsdatum
	Ausreichend für <n> Tests		Temperaturgrenze
	Gebrauchsanweisung beachten		Trocken halten
	Hier nach oben		Zerbrechlich, mit Vorsicht zu behandeln
COMP	Kitkomponenten	Done?☐	Kreuzen Sie das Kästchen an, nachdem Sie Ethanol in das Fläschchen gegeben haben
ADD	Hinzufügen von	EtOH	Ethanol
	Importeur		

Änderungshistorie

Änderung	Datum des Inkrafttretens	Änderungshistorie
B1.0	26.05.2022	Erste Ausgabe
V01	04.11.2022	1. Fügen Sie das Symbol und die Informationen des Importeurs hinzu; 2. Änderungshistorie hinzufügen; 3. Verschieben Sie das "Gültigkeitsdatum" von der ersten auf die letzte Seite; 4. Umsetzung der neuen Kodierungsregeln.
V02	10.03.2025	Aktualisierung des europäischen und schweizerischen Bevollmächtigten