



AmoyDx[®] FFPE RNA Kit (Spin-Säule)

Gebrauchsanweisung

REF 8.02.0003 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



QbD RepS BV

Groenenborgerlaan 16
2610 Wilrijk
Belgien



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 RNA Kit wurde speziell für die Isolierung und Aufreinigung von Gesamt-RNA aus formalinfixierten, paraffineingebetteten (FFPE) Gewebeschnitten entwickelt. Die aufgereinigte RNA eignet sich für Downstream-Anwendungen wie Reverse Transkription, RT-PCR und quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).

Vorgesehener Anwender

Das AmoyDx® FFPE 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 RNA aus den Schnitten zu lösen. Eine kurze Inkubation bei höherer Temperatur kehrt die Formalin-Vernetzung der freigesetzten Nukleinsäuren teilweise um und verbessert so die RNA-Ausbeute und -Qualität sowie die Performance der RNA in nachfolgenden enzymatischen Assays. Als nächstes wird genomische DNA in der Lösung mittels DNase I entfernt. Das Lysat wird mit Puffer RPB 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
—	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. ×1
—	Zentrifugenröhrchen (1,5 mL)	Centrifugal Tubes (1.5 mL) 1.5 mL 离心管	54 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	900 µL ×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 RPB	Buffer RPB 结合液 RPB	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 RTE	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

Hinweis:

- 1) **Puffer RPB** und **Waschpuffer A** enthalten Guanidinsalz, das nicht in Kontakt mit bleichmittelhaltigen Desinfektionsmitteln gebracht werden darf.
- 2) Geben Sie vor der ersten Verwendung 17 mL bzw. 24 mL absolutes Ethanol zu **Waschpuffer A** und **Waschpuffer B** und mischen Sie diese gründlich.
- 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.

Lagerung und Stabilität

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

Zusätzlich benötigte Reagenzien und Ausrüstung

- 1) Ethanol (96~100 %).
- 2) Xylol.
- 3) Mikrozentrifuge (13.000 ×g einstellbar).
- 4) Vortexer.
- 5) Handzentrifuge.
- 6) Thermomixer mit Block für 1,5 mL Röhren (37~80 °C und 500 U/min einstellbar).
- 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 anderen Reagenzien aus anderen Chargen.
- Verwenden Sie KEINE Reagenzien anderer Testkits.

Sicherheitsinformationen

- **Puffer RPB** und **Waschpuffer A** 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

Gefahrenhinweise:

H302+H332:

H315:

H319:

Sicherheitshinweise

P261:

P264:

P301+P312:

P302+P352:

P304+P340+P312:

P305+P351+P388:

Warnung

Gesundheitsschädlich beim Verschlucken oder beim Einatmen.

Verursacht Hautreizungen.

Verursacht schwere Augenreizungen.

Vermeiden Sie das Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol.

Waschen Sie die Haut nach dem Umgang gründlich.

BEIM VERSCHLUCKEN: Rufen Sie ein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder einen Arzt an, wenn Sie sich unwohl fühlen.

BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Waschen Sie sich mit viel Wasser und Seife.

BEI EINATMEN: Bringen Sie die Person an die frische Luft und sorgen Sie für eine ungehinderte Atmung.

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 RNase- 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 RNA-Fragmentierung zu begrenzen, beachten Sie folgende Empfehlungen:

- 1) Fixieren Sie die Gewebeprobe 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 Gewebeprobe 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 die FFPE-Gewebeprobe 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, den FFPE-Gewebeblock für die RNA-Extraktion direkt in ein Zentrifugenröhrchen zu FFPE-Geweberöllchen zu schneiden.
- 6) Wenn Sie FFPE-Gewebeobjektträger für die 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-Gewebeprobe sollte weniger als 3 Jahre betragen.
- 8) Die Anforderungen an die FFPE-Gewebeprobe für die RNA-Extraktion unterscheiden sich je nach FFPE-Gewebetyp (Tabelle 2). Die Menge der FFPE-Gewebeprobe wirkt sich direkt auf die RNA-Ausbeute aus.

Tabelle 2 Empfohlene FFPE-Gewebeschnitte für die 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 Klinge 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 und 2 µL Gewebe-Tracer hinzu, schließen Sie den Deckel und vortexen Sie das Röhrchen kräftig für 10 Sekunden. Inkubieren Sie bei 56 °C 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 verdampft ist, da das Ethanol die RNA-Extraktion beeinträchtigen kann.*

2. RNA-Extraktion

Hinweis:

- *Geben Sie vor der ersten Verwendung 17 mL bzw. 24 mL absolutes Ethanol zu **Waschpuffer A** und **Waschpuffer B**, und mischen Sie diese gründlich.*
 - *Geben Sie vor der ersten Verwendung 360 µL **RNase-freies Wasser** in das **DNase I (30 U/µL)**-Röhrchen, 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 °C.*
 - *Überprüfen Sie vor der RNA-Extraktion, dass die Reagenzien nicht auslaufen. Schütteln Sie die Reagenzien vorsichtig, um die Lösung zu mischen. Wenn die Reagenzien Präzipitate enthalten, lösen Sie diese durch Erhitzen auf 50 °C auf.*
- 2.1 Geben Sie 160 µL **Puffer RTL** und 20 µL **Proteinase K-Lösung** in das obige Zentrifugenröhrchen und mischen Sie die Lösung durch Vortexen. Zentrifugieren Sie kurz für 5 Sekunden und inkubieren Sie anschließend unter Schütteln (500 U/min) bei 56 °C für 30 Minuten im Thermomixer.
 - 2.2 Geben Sie das Zentrifugenröhrchen in den Thermomixer und inkubieren Sie es unter Schütteln (500 U/min) bei 80 °C für 30 Minuten.
 - 2.3 Lassen Sie die Probe auf Raumtemperatur abkühlen, dann zentrifugieren Sie kurz für 5 Sekunden.
 - 2.4 Entsprechend dem Verhältnis von 20 µL 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 vorzubereiten.
Hinweis: *Der DNase I-Master Mix sollte erst kurz vor der Verwendung zubereitet werden.*
 - 2.5 Geben Sie 30 µL DNase I-Master Mix zu der Probe und mischen Sie vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren. Inkubieren Sie bei 37 °C für 15 Minuten.
 - 2.6 Zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 3 Minuten und überführen Sie den Überstand in ein neues 1,5 mL Zentrifugenröhrchen.
 - 2.7 Fügen Sie 340 µL **Puffer RPB** und 750 µL Ethanol (96~100 %) hinzu und mischen Sie gründlich durch Vortexen. Zentrifugieren Sie kurz für 5 Sekunden.
 - 2.8 Übertragen Sie 650 µL des Lysats im Zentrifugenröhrchen 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.
 - 2.9 Übertragen Sie das verbleibende Lysat 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.
Hinweis: *Das gesamte Lysat beträgt etwa 1300 µL, die zum Spinnen in zwei Teile geteilt werden.*
 - 2.10 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.
 - 2.11 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.
 - 2.12 Geben Sie 600 µL **Waschpuffer B** auf die RNA-Spin-Säule und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 30 Sekunden. Verwerfen Sie das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.
 - 2.13 Geben Sie die RNA-Spin-Säule in ein neues 2 mL Sammelröhrchen und zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 3 Minuten. Verwerfen

Sie das Sammelröhrchen mit dem Durchfluss.

- 2.14 Geben Sie die RNA-Spin-Säule in ein neues 1,5 mL Zentrifugenröhrchen. Lassen Sie die RNA-Spin-Säule geöffnet und inkubieren Sie sie bei 56 °C für 3 Minuten.
- 2.15 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.
Hinweis: Der Puffer RTE-Mix sollte vor der Verwendung zubereitet werden.
- 2.16 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 °C für 2 Minuten. Zentrifugieren Sie bei 13.000 ×g für 1 Minute.
Hinweis: 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 °C 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 bei 56 °C für 2 Minuten und zentrifugieren bei 13.000 ×g für 1 Minute.)
- 2.17 Die eluierte RNA in dem Zentrifugenröhrchen ist sofort einsatzbereit. Wenn die RNA nicht innerhalb von 2 Stunden verwendet wird, sollte sie bei -70 °C gelagert werden.

Leistungsmerkmale

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

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

Einschränkungen

1. Die Qualität der extrahierten 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 aufgereinigten 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 RNA sollte nicht für Downstream-Anwendungen verwendet werden, die RNA in voller Länge benötigen.

Allgemeine Hinweise

Sollte es bei der Verwendung dieses Kits oder als Folge davon zu einem schwerwiegenden Zwischenfall kommen, 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

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

Änderungshistorie

Änderung	Datum des Inkrafttretens	Änderungshistorie
B1.0	26.05.2022	Erste Ausgabe
V01	04.11.2022	<ol style="list-style-type: none"> 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