

Agosto 2015

Hoja de protocolo del instrumento QIAasymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP y

Tissue_HC_200_V7_DSP

Este documento es Hoja de protocolo del instrumento QIAasymphony SP para los protocolos *Tissue_LC_200_V7_DSP* y *Tissue_HC_200_V7_DSP*, R2, para la versión 1 del kit.

Información general

Para el diagnóstico in vitro.

Estos protocolos sirven para la purificación del ADN total procedente de tejidos y de tejidos fijados con formalina e incorporados en parafina (FFPE) mediante el instrumento QIASymphony® SP y el kit QIASymphony DSP DNA Mini.

En función del tipo de muestra recomendamos usar un protocolo de bajo contenido (LC) o de alto contenido (HC). Los tejidos proporcionarán valores de ADN mayores si se procesan con el protocolo de alto contenido, pero se puede utilizar el protocolo de bajo contenido en combinación con un volumen de elución reducido (50 µl), si se necesita una concentración elevada de ADN. Para los tejidos FFPE recomendamos utilizar el protocolo de bajo contenido.

Protocolo de bajo contenido

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de catálogo 937236)
Material de muestra	Tejido FFPE y tejido* En una preparación se pueden combinar hasta 4 cortes de tejido FFPE, cada uno con un grosor máximo de 10 µm, u 8 secciones con un grosor máximo de 5 µm y una superficie máxima de 250 mm².
Nombre del protocolo	Tissue_LC_200_V7_DSP
Juego de controles del ensayo predeterminado	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volumen de elución	50 µl, 100 µl, 200 µl o 400 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0

* Consulte el protocolo de alto contenido para obtener información sobre las muestras de tejidos.

Protocolo de alto contenido

Kit	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (n.º de catálogo 937236)
Material de muestra	Tejido Si no se dispone de información sobre el rendimiento esperado, recomendamos comenzar con 25 mg de material de muestra. En función del rendimiento obtenido, se puede aumentar el tamaño de la muestra en las preparaciones subsiguientes.
Nombre del protocolo	Tissue_HC_200_V7_DSP
Juego de controles del ensayo predeterminado	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volumen de elución	100 µl, 200 µl o 400 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0

Materiales necesarios pero no suministrados

Para todos los tipos de muestras

- Tampón ATL, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, n.º de catálogo 939016)
- Para reducir al mínimo el contenido de ARN: ARNasa A libre de ADNasa (solución de partida de 100 mg/ml)

Para tejidos FFPE (desparafinización sin xileno)

- Solución de desparafinización (Deparaffinization Solution, n.º de catálogo 939018)

Para tejidos FFPE (desparafinización con xileno)

- Xileno (99–100%)
- Etanol (96–100%)*

* No utilice alcohol desnaturalizado que contenga sustancias adicionales como p. ej. metanol o metiletilcetona.

Cajón "Sample" (Muestras)

Tipo de muestra	Tejido FFPE y tejido
Volumen de entrada de muestras	220 µl (necesarios por muestra, por protocolo)*
Volumen de muestra procesado	200 µl
Tubos de muestra primarios	n/a
Tubos de muestra secundarios	Para obtener más información, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Insertos	Dependen del tipo de tubo de muestra utilizado; para obtener más información, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

† Para los protocolos de alto contenido alto y de bajo contenido, el sistema no reconocerá si el volumen de la muestra es inferior a 220 µl debido a que la transferencia de la muestra se realiza sin detección del nivel de líquido. Por consiguiente, asegúrese de que el volumen de entrada de la muestra sea 220 µl.

n/a = no aplicable.

Cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y consumibles)

Posición A1 y/o A2	Cartucho de reactivos
Posición B1	n/a
Soporte de gradillas de puntas 1–17	Puntas con filtro desechables, 200 µl o 1.500 µl
Soporte de caja unitaria 1–4	Cajas unitarias que contienen cartuchos de preparación de muestras o cubiertas para 8 barras

n/a = no aplicable.

Cajón "Waste" (Desechos)

Soporte de caja unitaria 1–4	Cajas unitarias vacías
Soporte de la bolsa de desechos	Bolsa de desechos
Soporte para frasco de desechos líquidos	Frasco de desechos líquidos vacío

Cajón "Eluate" (Eluidos)

Gradilla de elución (recomendamos utilizar la ranura 1, posición de refrigeración)	Para obtener más información, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
---	---

Materiales plásticos necesarios

Materiales plásticos	Un lote, 24 muestras*	Dos lotes, 48 muestras*	Tres lotes, 72 muestras*	Cuatro lotes, 96 muestras*
Puntas con filtro desechables, 200 µl††	26	50	74	98
Puntas con filtro desechables, 1.500 µl††	72	136	200	264
Cartuchos de preparación de muestras§	21	42	63	84
Cubiertas para 8 barras¶	3	6	9	12

* Si se utilizan menos de 24 muestras por lote se reduce el número de puntas con filtro desechables necesarias por ejecución.

† Hay 32 puntas con filtro por gradilla de puntas de filtro.

†† El número de puntas con filtro necesarias incluye las puntas con filtro para 1 examen de inventario por cartucho de reactivos.

§ Hay 28 cartuchos de preparación de muestras por caja unitaria.

¶ Hay doce cubiertas para 8 barras por caja unitaria.

Nota: Los números de puntas con filtro proporcionados pueden diferir de los números mostrados en la pantalla táctil dependiendo de la configuración. Recomendamos cargar el número máximo posible de puntas.

Volumen de elución

El volumen de elución se selecciona en la pantalla táctil. En función del tipo de muestra y del contenido de ADN, el volumen final de eluido puede ser en hasta 15 µl inferior al volumen seleccionado. Debido a que el volumen de eluido puede diferir, recomendamos comprobar el volumen de eluido real cuando utilice un sistema de preparación automatizada del ensayo que no verifique el volumen de eluido antes de la transferencia. Los volúmenes de eluido más bajos aumentan la concentración final de ADN, pero reducen ligeramente el rendimiento. Recomendamos utilizar un volumen de elución adecuado para la aplicación anterógrada prevista.

Preparación del material de muestra

Siempre que trabaje con productos químicos, utilice una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas protectoras. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS, *safety data sheets*) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

Cuestión importante antes de comenzar

- Las partículas magnéticas de QIAAsymphony purifican conjuntamente el ARN y el ADN si ambos están presentes en la muestra. Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada ARNasa A a la muestra en el paso indicado en el protocolo de pretratamiento correspondiente.

Antes de comenzar

- Compruebe si existe precipitado blanco en el tampón ATL. En caso necesario, incube durante 30 minutos a 37 °C, agitando ocasionalmente para disolver el precipitado.
- Ajuste una termomezcladora o un bloque térmico con agitador a la temperatura necesaria para el pretratamiento correspondiente.

Tejidos

Para la purificación del ADN se pueden utilizar tejidos frescos y congelados. Los valores de ADN y la calidad dependerán del tipo de tejido, del origen y de las condiciones de conservación. El tejido fresco se puede cortar en pequeños trozos y almacenar a -20 °C o -80 °C antes del procesamiento. En general recomendamos usar el protocolo de alto contenido que proporcionará valores de ADN mayores. El protocolo de bajo contenido en combinación con el volumen de elución de 50 μl solo se recomienda si se necesitan concentraciones elevadas de ADN para análisis anterógrados. Si no se dispone de información sobre el rendimiento esperado, recomendamos comenzar con 25 mg de material de muestra y utilizar el protocolo de alto contenido y el volumen de elución de 200 μl . En función del rendimiento obtenido, se puede aumentar el tamaño de la muestra o reducir el volumen de elución en las preparaciones subsiguientes. Tenga en cuenta que la sobrecarga de las preparaciones en combinación con volúmenes de elución reducidos puede provocar un arrastre de partículas magnéticas hacia el eluido y comprometer la pureza del ADN y el análisis anterógrado.

Protocolo de pretratamiento para tejidos

1. Transfiera la muestra de tejido a un tubo para microcentrifugadora de 2 ml (no suministrado).
2. Añada 220 µl de tampón ATL.
3. Añada 20 µl de proteinasa K y mezcle golpeando ligeramente el tubo.

Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del kit QIAasymphony DSP DNA Mini.

4. Coloque el tubo en un ThermoMixer o en un agitador-incubador e incúbelo a 56 °C agitándolo a 900 rpm hasta la lisis completa del tejido.

Nota: El tiempo de lisis depende del tipo de tejido procesado. Para la mayoría de los tejidos, la lisis habrá finalizado en el plazo de 3 horas. Si la lisis todavía es incompleta después de 3 horas, tal como lo indica la presencia de material insoluble o de lisados altamente viscosos, puede prolongar el tiempo de lisis o eliminar el material insoluble por centrifugado como se describe en el paso 6. Es posible realizar una lisis durante la noche, lo que no afectará a la preparación.

5. Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada 4 µl de ARNasa A (100 mg/ml) e incube la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) antes de continuar con el paso 6.
6. Homogeneice la muestra pipeteando arriba y abajo varias veces.

Nota: Si todavía detecta trozos de material insoluble, centrifugue a 3.000 x g durante 1 minuto.

7. Transfiera con cuidado 220 µl del sobrenadante a tubos de muestra compatibles con el soporte para muestras del instrumento QIAasymphony SP.

Para una lista completa de tubos de muestra compatibles, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomendamos utilizar tubos de 2 ml (p. ej. Sarstedt, n.º de catálogo 72.693 o 72.608).

Tejido FFPE

La fijación con formalina y los procedimientos de incorporación en parafina convencionales provocan siempre una fragmentación significativa de los ácidos nucleicos. Para limitar el grado de fragmentación del ADN, asegúrese de:

- fijar las muestras de tejido con formalina del 4 al 10% tan rápido como sea posible tras la extracción quirúrgica.
- aplicar un tiempo de fijación de 14 a 24 horas (los tiempos de fijación superiores producen una fragmentación más intensa del ADN, provocando un rendimiento deficiente en los análisis anterógrados)

- deshidratar las muestras meticulosamente antes de incorporarlas (los restos de formalina pueden inhibir la digestión por la proteinasa K)

El material de partida para la purificación del ADN debe estar compuesto por cortes recientes de tejido FFPE. En una preparación se pueden procesar hasta 4 cortes, cada uno con un grosor máximo de 10 µm, u 8 secciones con un grosor máximo de 5 µm y una superficie máxima de 250 mm². Si no dispone de información acerca de la naturaleza de su material de partida, le recomendamos que comience con no más de 3 cortes en una única preparación. En función del rendimiento y de la pureza del ADN es posible utilizar un máximo de 8 cortes en las preparaciones subsiguientes.

Nota: Los protocolos para tejidos FFPE están específicamente diseñados para purificar conjuntamente solo cantidades reducidas de ARN. Esto producirá un valor bajo de medición fotométrica en comparación con los valores obtenidos con el kit manual QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue.

Protocolo de pretratamiento para tejidos FFPE

Método 1: desparafinización con solución de desparafinización

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.
2. Seccione un máximo de 4 cortes con un grosor de 10 µm o un máximo de 8 cortes con un grosor de 5 µm.
Nota: Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine los primeros 2 a 3 cortes.
3. Introduzca los cortes inmediatamente en un tubo Sarstedt de 2 ml (no suministrado, n.º de catálogo 72.693 o 72.608) que sea compatible con el soporte para muestras del instrumento QIASymphony SP.
4. Añada 200 µl de tampón ATL a los cortes.
5. Añada 20 µl de proteinasa K.
Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del kit QIASymphony DSP DNA Mini.
6. Añada 160 µl o 320 µl de solución de desparafinización (ver tabla siguiente) y mezcle mediante agitación vorticial..

Grosor de los cortes	Número de cortes	Volumen de solución de desparafinización
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

7. Coloque el tubo en una termoagitadora o en un bloque térmico con agitador e incúbelo a 56 °C durante 1 hora, agitándolo a 1.000 rpm hasta que el tejido se haya lisado completamente.

Nota: El tiempo de lisis depende del tipo de tejido procesado. Para la mayoría de los tejidos, la lisis habrá finalizado en el plazo de 1 hora. Si la lisis todavía es incompleta después de 1 hora, tal como lo indica la presencia de material insoluble, puede prolongar el tiempo de lisis o eliminar el material insoluble por centrifugado como se describe en el paso 10. Es posible realizar una lisis durante la noche, lo que no afectará a la preparación.

8. Incube a 90 °C durante 1 hora.

Nota: La incubación a 90 °C en tampón ATL invierte parcialmente la alteración de los ácidos nucleicos por el formaldehído. Los tiempos de incubación más largos o las temperaturas de incubación mayores pueden provocar una fragmentación más intensa del ADN. Si solo usa un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56 °C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 90 °C.

9. Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada 2 µl de ARNasa A (100 mg/ml) a la fase inferior e incube la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 10. Deje que la muestra se enfríe hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de añadir ARNasa A.

10. Centrifugue a velocidad máxima durante 1 minuto a temperatura ambiente.

11. Transfiera los tubos (que contienen las dos fases) con cuidado al soporte para muestras del instrumento QIA Symphony SP.

Método 2: desparafinización con xileno

1. Recorte con un bisturí la parafina sobrante del bloque de muestra.

2. Seccione un máximo de 4 cortes con un grosor de 10 µm o un máximo de 8 cortes con un grosor de 5 µm.

Nota: Si la superficie de la muestra ha estado expuesta al aire, elimine los primeros 2 a 3 cortes.

3. Introduzca los cortes inmediatamente en un tubo para microcentrifugadora de 1,5 o 2 ml (no suministrado) y añada 1 ml de xileno a la muestra. Cierre la tapa y mezcle vigorosamente mediante agitación vorticial durante 10 segundos.
4. Centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente.
5. Elimine el sobrenadante mediante pipeteo. No elimine ninguna parte del sedimento.
6. Añada 1 ml de etanol (96–100%) al sedimento y mezcle mediante agitación vorticial.
Nota: El etanol extrae el xileno residual de la muestra.
7. Centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente.
8. Elimine el sobrenadante mediante pipeteo. No elimine ninguna parte del sedimento.
Nota: Elimine con cuidado cualquier resto de etanol con una punta de pipeta fina.
9. Abra el tubo e incúbelo a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 10 minutos o hasta que se haya evaporado todo el etanol residual.
Nota: La incubación se puede realizar a una temperatura máxima de 37 °C.
10. Resuspenda el sedimento en 220 µl de tampón ATL.
11. Añada 20 µl de proteinasa K y mezcle mediante agitación vorticial.
Nota: Use proteinasa K de la gradilla de enzimas del kit QIASymphony DSP DNA Mini.
12. Incube a 56 °C durante 1 hora (o hasta que la muestra se haya lisado completamente).
Nota: El tiempo de lisis depende del tipo de tejido procesado. Para la mayoría de los tejidos, la lisis habrá finalizado en el plazo de 1 hora. Si la lisis todavía es incompleta después de 1 hora, tal como lo indica la presencia de material insoluble, puede prolongar el tiempo de lisis o eliminar el material insoluble por centrifugado como se describe en el paso 16. Es posible realizar una lisis durante la noche, lo que no afectará a la preparación.
13. Incube a 90 °C durante 1 hora.
Nota: La incubación a 90 °C en tampón ATL invierte parcialmente la alteración de los ácidos nucleicos por el formaldehído. Los tiempos de incubación más largos o las temperaturas de incubación mayores pueden provocar una fragmentación más intensa del ADN. Si solo usa un único bloque calefactor, deje la muestra a temperatura ambiente tras la incubación a 56 °C hasta que el bloque calefactor haya alcanzado los 90 °C.
14. Centrifugue brevemente la muestra para eliminar las gotas del interior del tapón.
15. Para reducir al mínimo el contenido de ARN de la muestra, añada 2 µl de ARNasa A (100 mg/ml) e incube la mezcla durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar con el paso 16. Deje que la muestra se enfríe hasta alcanzar la temperatura ambiente antes de añadir ARNasa A.
16. Transfiera con cuidado 220 µl del lisado a tubos de muestra compatibles con el soporte para muestras del instrumento QIASymphony SP.

Nota: Si el lisado contiene material no digerido, centrifugue a velocidad máxima durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de transferir el sobrenadante a los tubos de muestra. Para una lista completa de tubos de muestra compatibles, consulte www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomendamos utilizar tubos de 2 ml (p. ej. Sarstedt, n.º de catálogo 72.693 o 72.608).

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al servicio técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales. 08/2015 HB-0977-S01-002 © 2012-2015 QIAGEN, todos los derechos reservados.

