

Dezembro 2017

Ficha de protocolo do QIASymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP e Tissue_HC_200_V7_DSP

Este documento é Tissue_LC_200_V7_DSP e Tissue_HC_200_V7_DSP QIASymphony SP Protocol Sheet, R3, do QIASymphony DSP DNA Mini Kit, versão 1.

Informações gerais

O kit QIASymphony DSP DNA destina-se ao uso diagnóstico in vitro.

Estes protocolos destinam-se à purificação do DNA total de tecidos e tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (formalin-fixed, paraffin-embedded, FFPE) utilizando o QIASymphony SP e o QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

Dependendo do tipo de amostra, recomendamos o uso do protocolo de baixo conteúdo (low content, LC) ou alto conteúdo (high content, HC). Os tecidos fornecerão maiores rendimentos de DNA quando processados com o protocolo de alto conteúdo, mas o protocolo de baixo conteúdo, em combinação com um pequeno volume de eluição (50 µl), pode ser usado se for necessária uma alta concentração de DNA. Para tecido FFPE, recomendamos o uso do protocolo de baixo conteúdo.

Protocolo de baixo conteúdo

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Ref. 937236)
Material da amostra	Tecido e tecido FFPE * Até 4 seções de tecido FFPE, cada uma com uma espessura de até 10 µm, ou 8 seções, com uma espessura de até 5 µm e uma área de superfície de até 250 mm ² , podem ser combinadas em uma preparação.
Nome do protocolo	Tissue_LC_200_V7_DSP
Conjunto padrão de controle de teste	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volume de eluição	50 µl, 100 µl, 200 µl ou 400 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior

* Veja o protocolo de alto conteúdo para informações sobre amostras de tecido.

Protocolo de alto conteúdo

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (Ref. 937236)
Material da amostra	Tecido Se as informações sobre o rendimento esperado não estiverem disponíveis, recomendamos começar com 25 mg de material de amostra. Dependendo do rendimento obtido, o tamanho da amostra pode ser aumentado em preparações subsequentes.
Nome do protocolo	Tissue_HC_200_V7_DSP
Conjunto padrão de controle de teste	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volume de eluição	100 µl, 200 µl ou 400 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior

Materiais necessários mas não fornecidos

Para todos os tipos de amostra

- Tampão ATL, 4 x 50 ml (ref. n° 939016)
- Para minimizar o conteúdo de RNA: RNase A sem DNase (solução estoque de 100 mg/ml)

Para tecido FFPE (desparafinização sem xileno)

- Solução de Desparafinização (ref. n° 939018)

Para tecido FFPE (desparafinização com xileno)

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

Gaveta “Sample” (Amostra)

Tipo de amostra	Tecido e tecido FFPE
Volume de entrada de amostra	220 µl (requerido por amostra, protocolo) [†]
Volume de amostra processado	200 µl
 Tubos de amostra primários	n/a
 Tubos de amostra secundários	Acesse www.qiagen.com/goto/dsphandbooks para obter mais informações.
Introdutores	Depende do tipo de tubo de amostra usado; para mais informações, acesse www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

[†] Para protocolos de conteúdo alto e baixo, o sistema não reconhecerá se o volume da amostra for menor que 220 µl, pois a transferência da amostra é realizada sem a detecção do nível de líquido. Portanto, certifique-se de que o volume de entrada da amostra seja de 220 µl.

n/a = não aplicável.

Gaveta “Reagents and Consumables” (Reagentes e materiais de consumo)

Posição A1 e/ou A2	Cartucho de reagentes
Posição B1	n/a
Suporte de rack para ponteiros, 1-17	Ponteiros com filtro descartáveis, 200 µl ou 1500 µl

n/a = não aplicável.

* Não use álcool desnatado, que contém substâncias adicionais, como metanol ou metiletilcetona.

Suporte de caixa unitária, 1-4

Caixas unitárias com cartuchos de preparo de amostra ou tampas de 8 hastes

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitária, 1-4

Caixas unitárias vazias

Suporte de saco de resíduos

Saco de resíduos

Suporte de recipiente de resíduos líquidos

Recipiente de resíduos líquidos vazio

Gaveta "Eluate" (Eluído)

Rack de eluição (recomendamos o uso da fenda 1 na posição de resfriamento)Acesse www.qiagen.com/goto/dsphanbooks para obter mais informações.

Materiais plásticos necessários

Materiais plásticos	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 72 amostras*	Quatro lotes, 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl [†]	26	50	74	98
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl [†]	72	136	200	264
Cartuchos de preparação de amostras [§]	21	42	63	84
Tampas de 8 hastes [¶]	3	6	9	12

* Utilizar menos de 24 amostras por lote reduz o número de ponteiras com filtro descartáveis necessárias por execução de teste.

[†] Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteira com filtro.

[‡] O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por cartucho de reagentes.

[§] Há 28 cartuchos de preparo de amostra por caixa unitária.

[¶] Há doze tampas de 8 hastes por caixa unitária.

Nota: Dependendo das configurações, a quantidade de ponteiras com filtro fornecida pode diferir da quantidade exibida na tela sensível ao toque. Recomendamos carregar o maior número possível de ponteiras.

Volume de eluição

O volume de eluição é selecionado na tela sensível ao toque. Dependendo do tipo de amostra e do conteúdo de DNA, o volume final de eluato pode variar até 15 µl menos que o volume selecionado. Devido ao fato do volume de eluato poder variar, recomendamos verificar o volume

real do eluato ao usar um sistema de configuração de ensaio automatizado que não verifique o volume de eluato antes da transferência. A eluição em volumes menores aumenta a concentração final de DNA, mas reduz ligeiramente o rendimento. Recomendamos utilizar um volume de eluição adequado para a aplicação da jusante pretendida.

Preparo de material de amostra

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety data Sheets, SDS) disponíveis no fornecedor do produto.

Ponto importante antes de começar

- As partículas magnéticas do QIASymphony copurificam o RNA e DNA se ambos estiverem presentes na amostra. Para minimizar o conteúdo de RNA na amostra, adicione RNase A à amostra na etapa indicada no respectivo protocolo de pré-tratamento.

O que fazer antes de iniciar

- Verifique o tampão ATL quanto ao precipitado branco. Se necessário, incube durante 30 minutos a 37 °C com agitação ocasional para dissolver o precipitado.
- Coloque um ThermoMixer® ou shaker-incubator na temperatura exigida para o respectivo pré-tratamento.*

Tecidos

Tecidos frescos e congelados podem ser usados para purificação de DNA. O rendimento e a qualidade do DNA dependerão do tipo de tecido, fonte e condições de armazenamento. O tecido fresco pode ser cortado em pequenos pedaços e armazenado a -20 °C ou -80 °C antes do processamento. Em geral, recomendamos o uso do protocolo de alto conteúdo, que fornecerá maior rendimento de DNA. O protocolo de baixo teor, em combinação com o volume de eluição de 50 µl, só é recomendado se altas concentrações de DNA forem necessárias para a análise a jusante. Se as informações sobre o rendimento esperado não estiverem disponíveis, recomendamos começar com 25 mg de material de amostra usando o protocolo de alto conteúdo e o volume de eluição de 200 µl. Dependendo do rendimento obtido, o tamanho da amostra pode ser aumentado ou o volume de eluição pode ser diminuído nas preparações subseqüentes. Esteja ciente de que

* Certifique-se de que os instrumentos foram verificados, mantidos e calibrados regularmente de acordo com as instruções do fabricante.

as preparações de sobrecarga em combinação com pequenos volumes de eluição podem causar o transporte de partículas magnéticas para o eluato e comprometer a pureza do DNA e a análise a jusante.

Protocolo de pré-tratamento de tecido

1. Transfira a amostra de tecido para um tubo de microcentrífuga de 2 ml (não fornecido).
2. Adicione 220 µl de tampão ATL.
3. Adicione 20 µl de proteinase K e misture tamborilando os dedos no tubo.

Nota: Use a proteinase K do suporte de enzimas do QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Coloque o tubo em um ThermoMixer ou agitador-incubador e incube a 56 °C com agitação a 900 rpm até que o tecido esteja completamente lisado.

Nota: O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. Para a maioria dos tecidos, a lise é completada em 3 horas. Se a lise estiver incompleta após 3 horas, como indicado pela presença de material insolúvel, ou estiver altamente viscosa, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser removido por centrifugação, como descrito na etapa 6. A lise noturna é possível e não afeta a preparação.

5. Para minimizar o conteúdo de RNA na amostra, adicione 4 µL de RNase A (100 mg / ml) e incube durante 2 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de prosseguir para a etapa 6.
6. Homogeneíze a amostra pipetando-a várias vezes para cima e para baixo.
7. Transfira cuidadosamente 220 µl do sobrenadante para os tubos de amostra compatíveis com o transportador de amostras do QIAAsymphony SP.

Para obter uma lista completa de tubos de amostra compatíveis, acesse

www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomendamos a utilização de tubos de 2 ml (por exemplo, Sarstedt® ref. n° 72.693 ou 72.608).

Tecido FFPE

A fixação padrão de formalina e os procedimentos de inclusão em parafina sempre resultam em fragmentação significativa dos ácidos nucleicos. Para limitar a extensão da fragmentação do DNA, certifique-se de:

- Corrigir as amostras de tecido em 4-10% de formalina o mais rápido possível após a remoção cirúrgica

- Usar um tempo de fixação de 14 a 24 horas (tempos de fixação mais longos levam a uma fragmentação de DNA acentuada, resultando em um desempenho ruim nos ensaios a jusante)
- Desidratar completamente as amostras antes da incorporação (a formalina residual pode inibir a digestão da proteinase K)

O material inicial para a purificação do DNA deve ter seções recém-cortadas de tecido FFPE. Até 4 seções, cada uma com uma espessura de até 10 µm, ou 8 seções, com uma espessura de até 5 µm e uma área de superfície de até 250 mm², podem ser processadas em uma preparação. Se as informações sobre a natureza do seu material de partida não estiverem disponíveis, recomendamos começar com não mais que 3 seções em uma única preparação. Dependendo do rendimento e pureza do DNA, é possível usar até 8 seções nas preparações subsequentes.

Nota: Os protocolos de tecido FFPE são especialmente projetados apenas para copurificar pequenas quantidades de RNA. Isso levará a um valor de medição fotométrica reduzido em comparação com os valores obtidos com o kit de tecido FFPE manual QIAamp® DSP DNA.

Protocolo de pré-tratamento de tecido FFPE

Método 1: desparafinização usando solução de desparafinização

1. Usando um bisturi, corte o excesso de parafina do bloco de amostra.
2. Corte até 4 seções de 10 µm de espessura ou até 8 seções de 5 µm de espessura.

Nota: Se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, descarte as primeiras 2-3 seções.

3. Coloque imediatamente as seções num tubo Sarstedt de 2 ml (não fornecido, ref. n° 72.693 ou 72.608) que seja compatível com o transportador de amostras do QIASymphony SP.
4. Adicione 200 µl de tampão ATL às seções.
5. Adicione 20 µl de proteinase K.

Nota: Use a proteinase K do suporte de enzimas do QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

6. Adicione 160 µl ou 320 µl de solução de desparafinização (ver tabela abaixo) e a agite em vórtex.

Espessura das seções	Número de seções	Volume da solução de desparafinização
5 µm	1-4	160 µl
	5-8	320 µl
10 µm	1-2	160 µl
	3-4	320 µl

- Coloque o tubo em um ThermoMixer ou agitador-incubadora e incube a 56 °C por 1 hora com agitação a 1000 rpm até que o tecido esteja completamente lisado.

Nota: O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. Para a maioria dos tecidos, a lise é completada em 1 hora. Se a lise estiver incompleta após 1 hora, como indicado pela presença de material insolúvel, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser sedimentado por centrifugação como descrito na etapa 10. A lise noturna é possível e não afeta a preparação.

- Incube a 90 °C por 1 hora.

Nota: A incubação a 90 °C em tampão ATL inverte parcialmente a modificação de formaldeído dos ácidos nucleicos. Tempos de incubação mais longos ou temperaturas de incubação mais altas podem resultar em um DNA mais fragmentado. Se utilizar apenas um bloco de aquecimento, deixe a amostra à temperatura ambiente após a incubação a 56 °C até o bloco de aquecimento atingir 90 °C.

- Para minimizar o conteúdo de RNA na amostra, adicione 2 µL de RNase A (100 mg / ml) à fase inferior e incube por 2 minutos em temperatura ambiente antes de prosseguir para a etapa 10. Deixe a amostra esfriar à temperatura ambiente antes de adicionar a RNase A.
- Centrifugue à velocidade máxima durante 1 minuto à temperatura ambiente.
- Transfira cuidadosamente os tubos (contendo ambas as fases) para o transportador de amostras do QIAasymphony SP.

Método 2: desparafinização usando xileno

- Usando um bisturi, corte o excesso de parafina do bloco de amostra.
- Corte até 4 seções de 10 µm de espessura ou até 8 seções de 5 µm de espessura.

Nota: Se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, descarte as primeiras 2-3 seções.
- Coloque imediatamente as seções em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ou 2 ml (não fornecido) e adicione 1 ml de xileno à amostra. Feche a tampa e agite em vórtex vigorosamente por 10 segundos.
- Centrifugue à velocidade máxima durante 2 minutos à temperatura ambiente.

5. Remova o sobrenadante fazendo a pipetagem. Não remova nenhum pellet.
6. Adicione 1 ml de etanol (96–100%) ao pellet e agite em vórtex.
Nota: O etanol extrai o xileno residual da amostra.
7. Centrifugue à velocidade máxima durante 2 minutos à temperatura ambiente.
8. Remova o sobrenadante fazendo a pipetagem. Não remova nenhum pellet.
Nota: Remova cuidadosamente qualquer etanol residual usando uma ponta de pipeta fina.
9. Abra o tubo e incube à temperatura ambiente (15–25 °C) por 10 minutos ou até que todo o etanol residual tenha evaporado.
Nota: A incubação pode ser realizada a temperaturas até 37 °C.
10. Ressuspenda o pellet em 220 µl de tampão ATL.
11. Adicione 20 µl de proteinase K e misture agitando em vórtex.
Nota: Use a proteinase K do suporte de enzimas do QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
12. Incube a 56 °C por 1 hora (ou até que a amostra tenha sido completamente lisada).
Nota: O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. Para a maioria dos tecidos, a lise é completada em 1 hora. Se a lise estiver incompleta após 1 hora, como indicado pela presença de material insolúvel, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser removido por centrifugação como descrito na etapa 16. A lise noturna é possível e não afeta a preparação.
13. Incube a 90 °C por 1 hora.
Nota: A incubação a 90 °C em tampão ATL inverte parcialmente a modificação de formaldeído dos ácidos nucleicos. Tempos de incubação mais longos ou temperaturas de incubação mais altas podem resultar em um DNA mais fragmentado. Se utilizar apenas um bloco de aquecimento, deixe a amostra à temperatura ambiente após a incubação a 56 °C até o bloco de aquecimento atingir 90 °C.
14. Centrifugue brevemente a amostra para remover as gotas de dentro da tampa.
15. Para minimizar o conteúdo de RNA na amostra, adicione 2 µL de RNase A (100 mg / ml) e incube durante 2 minutos à temperatura ambiente antes de continuar com a etapa 16. Deixe a amostra esfriar à temperatura ambiente antes de adicionar a RNase A.
16. Transfira cuidadosamente 220 µl do lisado para os tubos de amostra compatíveis com o transportador de amostras do QIASymphony SP.
Nota: Se os lisados contiverem material não digerido, centrifugue em velocidade máxima por 2 minutos em temperatura ambiente antes de transferir o sobrenadante para tubos de amostra. Para obter uma lista completa de tubos de amostra compatíveis, acesse www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Recomendamos o uso de tubos de 2 ml (por exemplo, Sarstedt, ref. n° 72.693 ou 72.608).

Histórico de revisão

Histórico de revisão do documento	
R3 12/2017	Atualização para o software QIASymphony versão 5.0

Para informações atualizadas sobre licenças e avisos legais específicos de produtos, consulte o manual do kit da QIAGEN® pertinente ou o manual do usuário. Os manuais de instruções dos kits da QIAGEN e os manuais do usuário estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados aos Serviços técnicos da QIAGEN ou ao distribuidor local.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co); ThermoMixer® (Eppendorf AG). Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tais, não devem ser considerados como não protegidos pela lei.
12/2017 HB-0977-S01-003 © 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Pedido www.qiagen.com/shop | Assistência Técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com