

Instruções de uso (Manual) do RNeasy[®] DSP FFPE Kit



Versão 2

IVD

Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com o RNeasy DSP FFPE Kit

CE

REF

73604



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha

R1 MAT

1127532PTBR

Índice

Uso previsto	4
Usuário previsto	4
Descrição e princípio	5
Resumo e explicação	5
Princípios do procedimento	6
Materiais fornecidos	8
Conteúdo do kit	8
Componentes do kit.....	9
Materiais necessários, mas não fornecidos	10
Avisos e precauções	11
Informações de segurança.....	11
Informações de emergência.....	12
Precauções	12
Armazenamento e manuseio de reagentes	14
Estabilidade em uso.....	14
Componentes do kit.....	14
Procedimento	15
Pontos importantes antes de começar	15
Preparação de tampões	16
O que fazer antes de começar.....	17
Protocolo: Purificação de RNA total de seções de tecido FFPE	18
Controle de qualidade	22

Limitações	22
Características de desempenho	23
Descarte	24
Guia de solução de problemas	25
Símbolos	28
Informações de contato	30
Apêndice: Observações gerais sobre o manuseio de RNA	31
Informações para pedidos	34
Histórico de revisões do documento	35

Uso previsto

O RNeasy DSP FFPE Kit é um sistema que se destina à purificação manual de RNA total de tecidos fixados em formalina e conservados em parafina (Formalin-Fixed Paraffin Embedded FFPE).

Ele faz uso de um protocolo baseado em coluna giratória de sílica otimizado e inclui remoção enzimática de DNA residual.

O RNeasy DSP FFPE Kit destina-se a ser utilizado em diagnóstico in vitro

Usuário previsto

O produto destina-se a ser utilizado por usuários profissionais, como técnicos e médicos treinados em técnicas de biologia molecular.

Descrição e princípio

Resumo e explicação

O RNeasy DSP FFPE Kit é especialmente concebido para a purificação de RNA total de seções de tecidos fixados em formalina e conservados em parafina (Formalin-fixed Paraffin Embedded, FFPE). Ao isolar moléculas de RNA com mais de 70 nucleotídeos, o kit permite a recuperação de fragmentos de RNA utilizáveis em aplicações como RT-PCR.

Devido às condições de fixação e conservação, os ácidos nucleicos em amostras FFPE normalmente estão fragmentados e modificados quimicamente por formaldeído. Portanto, os ácidos nucleicos isolados de amostras FFPE têm, frequentemente, um peso molecular inferior ao obtido de amostras frescas ou congeladas. O grau de fragmentação depende do tipo e da idade da amostra, bem como das condições utilizadas para a fixação, a conservação e o armazenamento da amostra. Para a padronização de processos de exame prévio de tecidos FFPE, recomendamos proceder de acordo com a norma ISO 20166-1:2018 "Exames de diagnóstico in vitro moleculares – Especificações para os processos de exame prévio para tecidos fixados em formalina e conservados em parafina (FFPE) – Parte 1: RNA isolado".

Embora não seja possível detectar a modificação do formaldeído em ensaios de controle de qualidade padrão, como eletroforese em gel ou análise lab-on-a-chip, esta interfere fortemente com análises enzimáticas.

Enquanto o RNeasy DSP FFPE Kit é otimizado para reverter ao máximo a modificação do formaldeído sem posterior degradação do RNA, os ácidos nucleicos purificados a partir de amostras FFPE não devem ser usados em aplicações a jusante que requerem RNA a todo o comprimento. Algumas aplicações podem requerer modificações para permitir o uso de RNA fragmentado (por exemplo, concebendo pequenos amplicons para RT-PCR). Para cDNA sintetizado, devem ser usados primers específicos ao gene ou aleatórios em vez de primers oligo dT.

A coloração de seções FFPE também pode afetar a qualidade e o desempenho do RNA em aplicações a jusante. Esta afirmação é especialmente verdadeira para muitos protocolos de coloração imuno-histoquímica.

Princípios do procedimento

O procedimento RNeasy DSP FFPE usa tecnologia RNeasy consagrada para a purificação de RNA. As condições de lise especialmente otimizadas permitem a purificação eficaz de RNA total de seções de tecido FFPE. A etapa de digestão de DNase I remove eficientemente contaminações com DNA, incluindo moléculas altamente fragmentadas.

Em primeiro lugar, toda a parafina é removida de seções de tecido FFPE mediante tratamento com Deparaffinization Solution. Em seguida, as amostras são incubadas em um tampão de lise otimizado, que contém proteinase K para liberar RNA das seções. Uma incubação curta a uma temperatura elevada reverte parcialmente a ligação cruzada de formalina dos ácidos nucleicos liberados, melhorando o rendimento de RNA, bem como o desempenho de RNA em ensaios a jusante. Isto é seguido pelo tratamento de DNase I otimizado para eliminar DNA genômico, incluindo fragmentos de DNA muito pequenos que frequentemente estão presentes em amostras FFPE após tempos de armazenamento longos e/ou tempos de fixação em formalina prolongados. Em seguida, o lisado é misturado com Buffer RBC. É adicionado etanol para oferecer condições de ligação apropriadas para RNA e a amostra é aplicada a uma coluna de centrifugação RNeasy MinElute, na qual o RNA total se liga à membrana e os contaminantes são eficientemente lavados. A seguir, o RNA é eluído em, pelo menos, 14 µl de água sem RNase.

Procedimento RNeasy DSP FFPE

Seções de tecido FFPE

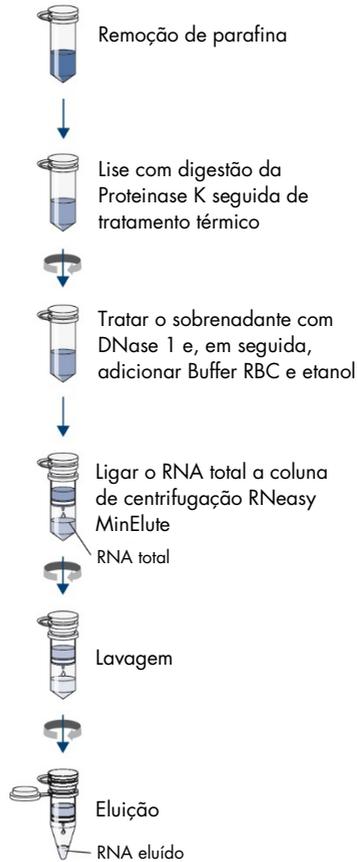


Figura 1. Procedimento de purificação de RNA de tecido FFPE usando o RNeasy DSP FFPE Kit.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

RNeasy DSP FFPE Kit	(50)
N° de referência	73604
Número de preparos	50

	Identificação	Símbolos	Quantidade
RNeasy MinElute Spin	Colunas de centrifugação RNeasy MinElute® Spin Columns (rosa) (cada uma em um tubo de coleta de 2 ml)	COL	50
ET	Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lise) (2 ml)	LYS TUBE	150
WT	Wash Tubes (Tubos de lavagem) (2 ml)	WASH TUBE	250
DPS	Deparaffinization Solution	DEPAR SOL	20 ml
RBC	Buffer RBC*	BIND BUF	45 ml
PKD	Buffer PKD	PROTK DIL	15 ml
PK	Proteinase K	PROTK	1,25 ml
DN	RNase-Free DNase I (DNase I isenta de RNase) (liofilizado)	DNase	1
RNFW	RNase-Free Water (Água isenta de RNase)	ELU DIL	3 x 1,5 ml
DBB	DNase Booster Buffer	DNase BUF	2 ml
RPE	Buffer RPE† (concentrado)	WASH BUF CONC	11 ml
HB, v2	Manual do RNeasy DSP FFPE Kit		1

* Contém um sal de guanidina. Não compatível com desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 11 para obter informações de segurança.

† Antes de usar pela primeira vez, adicione 4 volumes de etanol (96–100%, não desnaturado) conforme indicado no recipiente e descrito na página 16 para obter uma solução funcional.

Componentes do kit

Os componentes principais do kit são explicados abaixo.

Tabela 1. Reagentes fornecidos contendo princípios ativos

Reagente		Componentes	Volume
Símbolo	Nome		
DPS	Deparaffinization Solution	Hexadecano	≥90% a ≤100% w/w
RBC	Buffer RBC	Cloridrato de guanidina	≥30% a 70% w/w
PKD	Buffer PKD	Nenhum	–
PK	Proteinase K	Proteinase K	≥1% a <3% w/w
DN	RNase-Free DNase I (DNase I isenta de RNase) (liofilizado)	DNase	≥90% a ≤100% w/w
RNFW	RNase-Free Water (Água isenta de RNase)	Nenhum	–
DBB	DNase Booster Buffer	Nenhum	–
RPE	Buffer RPE (concentrado)	Nenhum	–

Para minimizar o risco de qualquer impacto negativo nos resultados do diagnóstico gerados após o isolamento de RNA, devem ser usados controles adequados para aplicações posteriores.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data sheets, SDSs) relevantes disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Certifique-se de que os instrumentos tenham sido verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

- Pipetas e ponteiros de pipeta estéreis isentas de RNase
- Microcentrífuga (com rotor para tubos de 2 ml)
- Agitador tipo vórtex
- Etanol a 96–100% (não use álcool desnaturalado, que contém outras substâncias como metanol ou metiletilcetona)
- Luvas descartáveis
- Bloco de aquecimento com função de agitação e capacidade de incubação a 56 °C e 80 °C

Avisos e precauções

Esteja ciente de que poderá ser necessário consultar seus regulamentos locais para relatar incidentes graves que tenham ocorrido em relação ao dispositivo ao fabricante e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Nesta fase de desenvolvimento do produto, todas as mitigações previstas foram implementadas quando possível, bem como foram sistematicamente revisadas. Com base no gerenciamento de riscos, o risco residual geral é considerado o aceitável e o uso do dispositivo é considerado seguro. Não há riscos residuais para o RNeasy DSP FFPE Kit.

Para uso em diagnóstico in vitro.

Leia atentamente todas as instruções antes de utilizar o kit.

Informações de segurança

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF no site www.qiagen.com/safety, no qual é possível encontrar, visualizar e imprimir a ficha SDS de cada Kit e componente de kit QIAGEN.

AVISO



Risco de lesões corporais

NÃO adicione alvejante ou soluções ácidas diretamente nos resíduos do preparo da amostra.

Os tampões no RNeasy DSP FFPE Kit contêm azida sódica. Se houver derramamento do líquido dos tampões do kit, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se o líquido

derramado tiver agentes potencialmente infecciosos, limpe primeiro a área afetada com detergente de laboratório e água e, em seguida, com hipoclorito de sódio a 1% (v/v).

Informações de emergência

CHEMTREC

EUA e Canadá 1-800-424-9300

Fora dos EUA e do Canadá +1 703-527-3887

Precauções

As seguintes declarações de risco e precaução se aplicam aos componentes do RNeasy DSP FFPE Kit.

PKD, RPE, RNF, DBB

Contém: Azida de sódio. Aviso! Pode ser nocivo se ingerido. Entre em contato com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou um médico se não se sentir bem.

Deparaffinization Solution



Contém: hexadecano. Perigo! Se ingerido ou entrar nas vias respiratórias, pode ser fatal. Causa irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Pode provocar irritação das vias respiratórias. Pode causar efeitos nocivos duradouros à vida aquática. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Entre em contato imediatamente com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou um médico. NÃO induza o vômito. Armazene em local trancado. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado.

Proteinase K



Contém: Proteinase K. Perigo! Causa irritação leve da pele. Se inalado, pode causar sintomas de asma ou alergia ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/névoa/vapores/spray. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contate um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou médico. Leve a pessoa para um local ao ar livre e deixe-a confortável para respirar. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado.

DNase I



Contém: DNase. Perigo! Pode provocar reação alérgica na pele. Se inalado, pode causar sintomas de asma ou alergia ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/névoa/vapores/spray. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória. Em caso de exposição ou suspeita de exposição: contate um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou médico. Leve a pessoa para um local ao ar livre e deixe-a confortável para respirar.

Buffer RBC



Contém: cloridrato de guanidina. Aviso! Nocivo, se engolido ou inalado. Causa irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

DNase Booster Buffer



Aviso! Causa irritação leve da pele. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Armazenamento e manuseio de reagentes

A RNase-Free DNase I e as colunas de centrifugação RNeasy MinElute Spin Columns devem ser armazenadas entre 2 e 8 °C imediatamente após a entrega. Os tampões podem ser conservados à temperatura ambiente (15–25 °C). Nessas condições, o kit pode ser armazenado conforme indica o prazo de validade na etiqueta da caixa, sem nenhuma redução no desempenho.

Não use o RNeasy DSP FFPE Kit com um prazo de validade vencido.

Estabilidade em uso

O kit pode ser usado por 10 meses após o primeiro uso ou até a data de validade.

Componentes do kit

Os prazos de validade de cada reagente estão indicados nas etiquetas de cada componente. Em condições de armazenamento corretas, o produto mantém o desempenho durante o período de estabilidade desde que sejam usados os mesmos lotes de componentes.

Para armazenamento a longo prazo de DNase I após reconstituição, remova a solução estoque do frasco, divida-a em alíquotas de uso único e armazene entre –15 e –30 °C por até 10 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2 e 8 °C por até 8 semanas. Depois de descongelar as alíquotas, não volte a congelá-las.

Evite a exposição dos reagentes a luz ultravioleta (UV) (por ex., usados para descontaminação), uma vez que tal exposição pode acelerar o envelhecimento.

Procedimento

Pontos importantes antes de começar

Material inicial

Os procedimentos padrão de fixação em formalina e conservação em parafina sempre resultam em fragmentação e ligação cruzada significativas dos ácidos nucleicos. Para limitar a extensão da fragmentação e da ligação cruzada de ácidos nucleicos, certifique-se de:

- Usar amostras de tecido com espessura inferior a 5 mm para permitir a penetração completa da formalina
- Fixar as amostras de tecido em formalina neutra tamponada a 4–10% o mais rápido possível após a remoção cirúrgica
- Usar um tempo de fixação máximo de 24 horas (tempos de fixação mais longos levam a uma fixação excessiva e a uma fragmentação mais acentuada dos ácidos nucleicos, resultando em um fraco desempenho em ensaios posteriores)
- Desidratar completamente as amostras antes da conservação
- Usar parafina de fusão baixa para a conservação

O material inicial para a purificação de RNA deve ter seções cortadas de tecido FFPE, cada uma com uma espessura de até 20 μm . Seções mais espessas podem resultar em rendimentos de ácidos nucleicos mais baixos, mesmo após uma incubação prolongada com proteinase K. Podem ser combinadas em uma preparação até 4 seções, cada uma com uma espessura de até 10 μm . Podem ser combinadas mais de 4 seções se a soma total da espessura das seções for de 40 μm ou menos (por exemplo, oito seções com espessura de 5 μm).

Para tecidos com conteúdo de DNA particularmente alto, é recomendável o uso de menos seções por preparação para evitar a contaminação por DNA do RNA purificado.

Se não existirem informações sobre a natureza da sua matéria-prima, recomendamos começar com não mais do que 2 seções por preparação. Dependendo do rendimento e da pureza do RNA, é possível usar até 4 seções em preparações subsequentes. Contudo, sobrecarregar a coluna de centrifugação RNeasy MinElute pode reduzir significativamente o rendimento e a qualidade do RNA.

Preparação de tampões

Preparar a solução de estoque de DNase I

Prepare a solução de estoque de DNase I dissolvendo DNase I liofilizada em 550 µl de água isenta de RNase. Para evitar a perda de DNase I, não abra o frasco. Injete água isenta de RNase no frasco usando uma seringa e uma agulha isentas de RNase. Misture cuidadosamente invertendo o frasco. Não agite em vórtex.

Em alguns casos, o frasco de DNase I parece estar vazio. Isso deve-se a enzimas liofilizadas que aderem ao septo. Para evitar a perda de DNase I, não abra o frasco. Em vez disso, dissolva a DNase I usando uma seringa e uma agulha conforme descrito abaixo.

Nota: A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser realizada invertendo cuidadosamente o frasco.

Nota: Garanta que o volume completo de água isenta de RNase seja injetado no frasco.

Após dissolver a DNase I, pode persistir material insolúvel. Devido ao processo de produção, pode estar presente material insolúvel na DNase I liofilizada. Isso não afeta o desempenho da DNase I.

Para armazenamento a longo prazo da DNase I, remova a solução estoque do frasco, divida-a em alíquotas de uso único e armazene entre -15 e -30 °C por até 10 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2 e 8 °C por até 8 semanas. Depois de descongelar as alíquotas, não volte a congelá-las.

Preparar o Buffer RPE

Adicione 4 volumes (44 ml) de etanol (96 a 100%) ao recipiente que contém 11 ml de Buffer RPE concentrado. Marque a caixa de seleção no rótulo do recipiente para indicar que foi adicionado etanol.

Nota: Antes de iniciar o procedimento, misture por agitação o Buffer RPE reconstituído.

O que fazer antes de começar

- Se estiver usando o RNeasy DSP FFPE Kit pela primeira vez, leia as "Pontos importantes antes de começar" (página 15)
- Se estiver trabalhando com RNA pela primeira vez, leia o "Apêndice: Observações gerais sobre o manuseio de RNA" (página 30).
- O Buffer RBC contém sal de guanidina e, por isso, não é compatível com reagentes desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 11 para obter informações de segurança.
- Salvo indicação em contrário, realize todas as etapas do procedimento à temperatura ambiente (15–25 °C). Durante o procedimento, trabalhe rapidamente; não faça intervalos.
- Realize todas as etapas de centrifugação usando uma microcentrífuga a uma temperatura de entre 15 a 25 °C. Se usar uma microcentrífuga refrigerada, defina a temperatura para 20 a 25 °C, caso contrário, pode ocorrer um resfriamento significativo abaixo de 15 °C.
- No procedimento abaixo, ▲ indica os volumes a serem usados se forem processadas 1 a 2 seções por amostra, enquanto ● indica os volumes a serem usado se forem processadas mais de 3 a 4 seções por amostra.
- Se usar Buffer RPE e RNase-Free DNase I pela primeira vez, reconstitua-os conforme descrito em "Preparação de tampões" (página 16).
- Coloque todos os tampões à temperatura ambiente (15–25 °C). Misture por agitação o Buffer RPE reconstituído.

- Coloque um misturador térmico a 56 °C para utilizá-lo nas etapas 5 e 9. Para reduzir o tempo de espera, coloque um segundo misturador térmico a 80 °C para utilizá-lo na etapa 9.
- Nota: Não interrompa o procedimento de purificação, pois os tempos de incubação aumentados podem causar a perda ou a degradação do RNA. O tempo de processamento médio de até 12 amostras em paralelo é de aproximadamente 130 minutos.

Protocolo: Purificação de RNA total de seções de tecido FFPE

1. Usando um bisturi, corte o excesso de parafina do bloco de amostra.
2. Corte seções com espessura de 5 a 20 µm.
Se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, descarte as primeiras 2–3 seções.
3. Coloque imediatamente as seções em um tubo da microcentrifuga de ▲ 1,5 ml ou ● 2 ml e feche a tampa.
4. Adicione ▲ 160 µl ou ■ 320 µl de Deparaffinization Solution, agite vigorosamente em vórtex por 10 segundos e centrifugue brevemente para que a amostra assente no fundo do tubo.
5. Incube a 56 °C por 3 minutos e, em seguida, deixe resfriar por 5 minutos à temperatura ambiente.
Se for usada muito pouca Deparaffinization Solution ou se for transportada parafina em excesso com a amostra, a Deparaffinization Solution pode ficar cerosa ou sólida após o resfriamento. Se esta situação ocorrer, adicione mais Deparaffinization Solution em etapas de 160 µl e repita a etapa 5.
6. Adicione ▲ 150 µl ou ● 240 µl de Buffer PKD e misture agitando em vórtex por 3 segundos.
7. Centrifugue por 1 minuto a 11.000 x g.
8. Adicione 10 µl de proteinase K à fase transparente mais inferior e misture pipetando cuidadosamente 10 vezes para cima e para baixo (não misture fases separadas).

9. Incube a 56 °C por 15 minutos a 1100 rpm e, em seguida, a 80 °C por 15 minutos a 1100 rpm.

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 80 °C.

Nota: A digestão completa de tecido por proteinase K não é necessária para um rendimento de RNA máximo; contudo, a etapa de incubação a 80 °C é crucial.

Importante: Certifique-se de que o bloco de aquecimento atinja 80 °C antes de iniciar a incubação de 15 minutos. A incubação de 15 minutos a 80 °C é fundamental para a inversão das ligações cruzadas de formaldeído e para um desempenho otimizado do RNA em aplicações a jusante, como real-time RT-PCR.

10. Centrifugue brevemente e transfira ▲ 145 ou ● 230 µl da fase incolor e mais inferior para um novo tubo da microcentrífuga de 1,5 ml.
11. Incube no gelo por 3 minutos. Em seguida, centrifugue por 15 minutos a 20.000 x g.
12. Transfira o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 2 ml, tomando cuidado para não perturbar o pellet.

O pellet contém detritos de tecido insolúvel, incluindo DNA de ligação cruzada.

13. Adicione uma quantidade de DNase Booster Buffer equivalente a um décimo do volume total da amostra (▲ 14,5 µl ou ● 23 µl) e 10 µl de solução de estoque de DNase I. Misture invertendo o tubo. Centrifugue brevemente para recolher líquido residual das laterais do tubo.

Nota: A DNase I é fornecida liofilizada e deve ser reconstituída conforme descrito em "Preparar a solução de estoque de DNase I", na página 16.

Nota: A DNase I é especialmente sensível à desnaturação. A mistura deve ser realizada invertendo cuidadosamente o tubo. Não agite em vórtex.

14. Incube à temperatura ambiente por 15 minutos.
15. Adicione ▲ 320 µl ou ● 500 µl de Buffer RBC para ajustar as condições de ligação e misture bem o lisado agitando em vórtex por 3 segundos e centrifugando brevemente.

16. Adicione ▲ 720 µl ou ■ 1200 µl de etanol (96–100%) à amostra. Não centrifugue. Passe imediatamente para a etapa 17.

Precipitados podem ser visíveis após a adição de etanol. Essa situação não afeta o procedimento.

17. Misture bem pipetando 5 vezes para cima e para baixo e transfira 700 µl da amostra, incluindo qualquer precipitado que se tenha formado, para uma coluna de centrifugação RNeasy MinElute colocada em um tubo de coleta de 2 ml. Feche a tampa cuidadosamente e centrifugue por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Descarte o tubo de coleta com o fluxo de passagem* e coloque a coluna em um novo tubo de coleta (fornecido).

18. Repita a etapa 17 (sem mistura adicional) até toda a amostra passar pela coluna de centrifugação RNeasy MinElute.

19. Adicione 500 µl de Buffer RPE à coluna de centrifugação RNeasy MinElute Spin Column. Feche a tampa cuidadosamente e centrifugue por 15 segundos a $\geq 8000 \times g$. Descarte o tubo de coleta com o fluxo de passagem* e coloque a coluna em um novo tubo de coleta (fornecido).

Nota: O Buffer RPE é fornecido como um concentrado. Certifique-se de adicionar etanol antes de usar, conforme descrito em "Preparar o Buffer RPE".

20. Adicione 500 µl de Buffer RPE à coluna de centrifugação RNeasy MinElute Spin Column. Feche a tampa cuidadosamente e centrifugue por 2 minutos a $\geq 8000 \times g$ para lavar a membrana da coluna de centrifugação. Descarte o tubo de coleta com o fluxo de passagem† e coloque a coluna em um novo tubo de coleta (fornecido).

Nota: Após a centrifugação, remova cuidadosamente a coluna de centrifugação RNeasy MinElute Spin Column do tubo de coleta para que a coluna não entre em contato com o fluxo de passagem. Caso contrário, ocorrerá carryover de etanol.

* O fluxo de passagem contém Buffer RBC e, portanto, não é compatível com alvejante. Consulte a página 8 para obter informações de segurança.

† O fluxo de passagem contém Buffer RBC e, portanto, não é compatível com alvejante. Consulte a página 8 para obter informações de segurança.

21. Abra a tampa da coluna de centrifugação e centrifugue à velocidade máxima por 5 minutos. Descarte o tubo de coleta com o fluxo de passagem.

Para evitar danos nas respectivas tampas, coloque as colunas de centrifugação na centrífuga com, pelo menos, uma posição vazia entre as colunas. Oriente as tampas de modo a apontarem em uma direção oposta ao sentido do rotor (por exemplo, se o rotor girar no sentido horário, oriente as tampas no sentido anti-horário).

É importante secar a membrana da coluna de centrifugação, pois o etanol residual pode interferir com reações a jusante. Centrifugar com as tampas abertas garante que nenhum etanol seja transportado durante a eluição de RNA.

22. Coloque a coluna de centrifugação RNeasy MinElute em um novo tubo de coleta de 1,5 ml (fornecido). Adicione 14 a 32 μ l de água isenta de RNase diretamente no centro da membrana da coluna de centrifugação. Feche a tampa cuidadosamente e centrifugue por 1 minuto à velocidade máxima para eluir o RNA.

Eluir com menores volumes de água isenta de RNase pode provocar concentrações de RNA total mais altas, mas com rendimentos de RNA mais baixos.

Nota: Para rendimentos de RNA baixos esperados, é recomendável o uso de tubos Low Bind (Ligação reduzida) para a eluição (não fornecidos). A média de volume morto da coluna de centrifugação RNeasy MinElute é de 2 μ l: a eluição com 14 μ l de água isenta de RNase resulta em aproximadamente 12 μ l de eluato.

23. Armazene eluatos de RNA entre -60 a -90 °C ou entre -15 a -30 °C por até 12 semanas.

Nota: A estabilidade do eluato dependerá do conteúdo e do tipo de RNA isolado, do volume de eluição e das condições de armazenamento. Recomendamos que os usuários estabeleçam a estabilidade do eluato em função dos seus requisitos específicos.

Controle de qualidade

Em conformidade com o sistema de gestão de qualidade com certificado ISO da QIAGEN, cada lote do RNeasy DSP FFPE Kit é testado relativamente a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade consistente do produto.

Limitações

O desempenho do sistema foi estabelecido em estudos de avaliação do desempenho, purificando RNA humano a partir de amostras fixadas em formalina e conservadas em parafina.

O usuário é responsável por validar o desempenho do sistema em quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não estejam abrangidos pelos estudos de avaliação de desempenho da QIAGEN.

Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados de diagnóstico, devem ser usados controles adequados para aplicações a jusante.

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

Características de desempenho

As características de desempenho aplicáveis estão disponíveis na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com.

Descarte

O resíduo contém amostras e reagentes. Este resíduo pode conter material tóxico ou infeccioso e deve ser descartado adequadamente. Consulte os regulamentos de segurança locais para obter procedimentos de descarte adequados.

Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF no site www.qiagen.com/safety, no qual é possível encontrar, visualizar e imprimir a ficha SDS de cada kit e componente de kit QIAGEN.

Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder quaisquer perguntas que você possa ter sobre as informações e/ou os protocolos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, acesse www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Coluna de centrifugação RNeasy MinElute obstruída

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Material inicial em excesso | Reduza a quantidade de material inicial. É fundamental usar a quantidade correta de material inicial (consulte a página 15). |
| b) | Temperatura de centrifugação muito baixa | A temperatura de centrifugação deve estar entre 15 a 25 °C. Algumas centrífugas podem resfriar abaixo de 15 °C, mesmo quando definidas para 20 °C. Isso pode causar a formação de precipitados que levam à obstrução da coluna de centrifugação RNeasy MinElute Spin Column. Se esta situação acontecer, defina a temperatura de centrifugação para 25 °C. |

Baixo rendimento de RNA

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Má qualidade do material inicial | As amostras fixadas por mais de 24 horas ou armazenadas por períodos muito longos podem conter muito pouco RNA utilizável.
As seções colocadas em lâminas de microscópio podem render muito pouco RNA utilizável devido a exposição prolongada ao ar. |
| b) | Material inicial em excesso | Sobrecarregar a coluna de centrifugação RNeasy MinElute Spin Column reduz significativamente os rendimentos de ácidos nucleicos. Reduza a quantidade de material inicial (consulte a página 15). |
| c) | O RNA permanece ligado à membrana da coluna de centrifugação RNeasy MinElute | Repita a eluição de RNA, mas incube a coluna de centrifugação RNeasy MinElute Spin Column na bancada por 10 minutos com RNFW antes da centrifugação. |

Comentários e sugestões

- d) Armazenamento incorreto de tampões/reagentes
- As colunas de centrifugação RNeasy MinElute Spin Columns, bem como a DNase I, precisam ser armazenadas entre 2 a 8 °C após a entrega do kit. Verifique se a temperatura de armazenamento está correta, uma vez que a exposição a temperaturas mais altas por longos períodos de tempo pode causar a perda de rendimento.
-

Valor A_{260}/A_{280} baixo

- Água usada na diluição de ácidos nucleicos para a medição de A_{260}/A_{280}
- Em vez de água, use 10 mM de Tris Cl com pH de 7,5 para diluir a amostra antes de medir a pureza.
-

Contaminação por DNA em experimentos a jusante

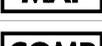
- a) Material inicial em excesso
- Em determinados tipos de tecido, a eficiência da remoção de DNA poderá ser reduzida quando são processadas grandes quantidades. Se o RNA eluído contiver uma contaminação substancial de DNA, tente processar menos seções de tecido por preparação.
- b) O tecido possui alto conteúdo de DNA
- Ao processar quantidades muito grandes de tecidos ricos em DNA (por exemplo, timo), o DNA pode não ser completamente digerido. Repita o procedimento de purificação usando menos seções de tecido. Verifique se a DNase I foi armazenado corretamente, conforme descrito em "Armazenamento e manuseio de reagentes" e "Preparar a solução de estoque de DNase I".
- c) Transcrição reversa com quantidade insuficiente de RNA
- A maioria das transcriptases reversas destina-se a ser usada com aproximadamente 1 µg de RNA. Se a transcrição reversa for realizada com quantidades muito pequenas de RNA, recomendamos o uso de uma transcriptase reversa especialmente concebida para transcrição reversa de alta sensibilidade.
-

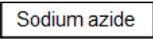
O RNA não tem bom desempenho em ensaios/aplicações posteriores

- a) RNA fragmentado ou bloqueado devido a modificação do formaldeído
- A incubação a 80 °C no procedimento RNeasy DSP FFPE é fundamental para um desempenho otimizado do RNA em transcrição reversa e outras aplicações enzimáticas a jusante. Certifique-se de que a temperatura de incubação é mantida a 80 °C durante todo o tempo de incubação de 15 minutos.
- Embora a incubação a 80 °C remova algumas das modificações do formaldeído, o RNA purificado de seções FFPE não é um modelo ideal para reações enzimáticas. Recomendamos apenas o uso de primers aleatórios ou primers específicos a genes para a síntese de cDNA. Também recomendamos manter os amplicons o mais curtos quanto possível para PCR (<500 nucleotídeos).
- b) Carryover de etanol
- Durante a segunda lavagem com Buffer RPE, certifique-se de que centrifuga a $\geq 8000 \times g$ por 2 minutos a 15 a 25 °C para secar a membrana da coluna de centrifugação RNeasy MinElute Spin Column. Após a centrifugação, remova cuidadosamente a coluna do tubo de coleta para que a coluna não entre em contato com o fluxo de passagem. Em seguida, coloque a coluna em um novo tubo de coleta e centrifugue à velocidade máxima por 5 minutos.
- c) Carryover de sal durante a eluição de RNA
- Certifique-se de que o Buffer RPE foi reconstituído adicionando o volume correto de etanol e que o tampão se encontra à temperatura ambiente (15 a 25 °C).
- d) Transcrição reversa com quantidade insuficiente de RNA
- A maioria das transcriptases reversas destina-se a ser usada com aproximadamente 1 μg de RNA. Se a transcrição reversa for realizada com quantidades muito pequenas de RNA, recomendamos o uso de uma transcriptase reversa especialmente concebida para transcrição reversa de alta sensibilidade.

Símbolos

Os seguintes símbolos são exibidos nas instruções de uso ou na embalagem e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
 Σ <N>	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu 2017/746 sobre dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Na chegada
	DN
	RNeasy MinElute Spin
	Número de referência
	Número de lote
	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
	Componentes (isto é, uma lista do que está incluso)
	Contém (conteúdo)

Símbolo	Definição do símbolo
	Número (isto é, frascos, recipientes)
	Número global de item comercial
Rn	R representa a revisão das Instruções de Uso (Manual) e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consultar as instruções de uso
	Cuidado
	Proteinase K
	Azida de sódio
	Identificador único de dispositivo

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site www.qiagen.com/Support, ligue 00800-22-44-6000 ou entre em contato com um dos Departamentos de Assistência Técnica da QIAGEN ou os distribuidores locais (consulte o verso do manual ou acesse www.qiagen.com).

Apêndice: Observações gerais sobre o manuseio de RNA

Manuseio de RNA

As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não precisam de cofatores para funcionar. Uma vez que as RNases são difíceis de inativar, bastando uma quantidade ínfima para destruir o RNA, não use utensílios de plástico ou de vidro sem, primeiro, eliminar possíveis contaminações com RNase. Aconselha-se extrema precaução para evitar introduzir inadvertidamente RNases na amostra de RNA durante ou depois do procedimento de purificação. Para criar e manter um ambiente sem RNase, as seguintes precauções deverão ser tomadas durante o pré-tratamento e o uso de vasos e soluções descartáveis e não descartáveis ao trabalhar com RNA.

Manuseio geral

Use sempre uma técnica asséptica e microbiológica adequada ao trabalhar com RNA. Partículas das mãos e de pó podem carregar bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação de RNase. Sempre use luvas de látex ou vinil durante o manuseio de reagentes e amostras de RNA, para evitar contaminações por RNase com origem na superfície da pele ou em poeira do equipamento de laboratório. Troque as luvas com frequência e mantenha os tubos fechados, sempre que possível. Mantenha o RNA purificado no gelo, quando as alíquotas forem pipetadas para aplicações descendentes.

Para remover contaminação por RNase de superfícies de bancada, utensílios de plástico não descartáveis e equipamento de laboratório (por exemplo, pipetas e tanques de eletroforese), recomendamos o uso de RNaseZap® (n° de ref. AM9780) da Ambion®. Alternativamente, as contaminações por RNase podem ser removidas usando reagentes laboratoriais comuns. Para descontaminar utensílios de plástico, lave com 0,1 M de NaOH, 1 mM de EDTA, seguidos de água isenta de RNase (consulte "Soluções" na página 33), ou lave com clorofórmio, caso os utensílios de plástico sejam resistentes a clorofórmio. Para descontaminar tanques de eletroforese, limpe com detergente (por exemplo, SDS a 0,5%), lave com água isenta de RNase, lave com etanol (caso os tanques sejam resistentes ao etanol) e deixe secar.

Utensílios de plástico descartáveis

O uso de tubos de polipropileno estéreis e descartáveis é recomendado durante o procedimento. Esses tubos, geralmente, não têm RNase e não requerem pré-tratamento para desativar as RNases.

Utensílios de vidro

Utensílios de vidro devem ser tratados antes de serem usados para garantir que não tenham RNase. Utensílios de vidro usados para trabalhar com RNA devem ser limpos com um detergente, completamente lavados e colocados no forno a 240 °C por pelo menos 4 horas (durante a noite, se for conveniente), antes de serem usados. Apenas colocar na autoclave não vai inativar completamente muitas RNases. Alternativamente, os utensílios de vidro podem ser tratados com DEPC (pirocarbonato de dietila), conforme descrito em "Soluções" a seguir.

Soluções

As soluções (água e outras soluções) devem ser tratadas com 0,1% O DEPC. DEPC é um inibidor forte, mas não absoluto, de RNases. É comumente usado a uma concentração de 0,1% para inativar RNases em utensílios de vidro ou de plástico ou para criar soluções e água isentas de RNase. O DEPC inativa as RNases por modificação covalente. Adicione 0,1 ml de DEPC a 100 ml da solução a ser tratada e agite vigorosamente, para misturar o DEPC à solução. Deixe a solução incubar durante 12 horas a 37° C. Coloque-a na autoclave durante 15 minutos, para remover qualquer traço de DEPC. O DEPC reagirá com as amins primárias e não pode ser usado diretamente para tratar soluções tampão Tris. O DEPC é altamente instável na presença de soluções tampão Tris e se decompõe rapidamente em etanol e CO₂. Ao preparar tampões Tris, trate a água com DEPC primeiro e, depois, dissolva o Tris para produzir o tampão adequado. Vestígios de DEPC modificarão os resíduos de purina no RNA por carboxilação. O RNA carboxilado é convertido com muito pouca eficiência em sistemas sem células. No entanto, sua habilidade de formar híbridos DNA:RNA ou RNA:RNA não é gravemente afetada, a menos que uma grande fração dos resíduos de purina tenham sido modificados. O DEPC residual devem sempre ser eliminado de soluções ou vasos colocando na autoclave ou aquecendo a 100 °C durante 15 minutos.

Nota: Os tampões RNeasy são garantidamente isentos de RNase sem recurso a qualquer tratamento de DEPC e, portanto, estão isentos de contaminação por DEPC.

Informações para pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
RNeasy DSP FFPE Kit (50)	50 colunas de centrifugação RNeasy MinElute Spin Columns, Elution Tubes, Wash Tubes, Lysis Tubes, RNase-free Reagents e RNase-free Buffers	73604

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	<p>Atualização da versão 2 do kit para conformidade com o IVDR.</p> <p>Nenhuma alteração nos protocolos ou desempenho em comparação com a versão 1 do kit</p> <p>Atualização de Avisos e precauções (adição de riscos residuais e informações de emergência)</p> <p>Adição da seção de descarte</p>

Acordo de Licença Limitada do RNeasy DSP FFPE Kit

O uso desse produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, dos seguintes termos:

1. O produto pode ser usado somente de acordo com os protocolos fornecidos com o produto e esse manual e para uso com componentes contidos apenas no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incorporar os componentes deste kit com quaisquer componentes não incluídos nele, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infringam os direitos de terceiros.
1. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização não infringam os direitos de terceiros.
2. Este kit e seus componentes são licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
3. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, à exceção das expressamente indicadas.
4. O comprador e o usuário do kit concordam em não tomar ou permitir que qualquer outra pessoa tome medidas que possam levar a ou facilitar qualquer um dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Acordo de licença limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, MinElute®, RNeasy® (QIAGEN Group); Ambion®, RNaseZap® (Thermo Fisher Scientific ou suas subsidiárias). Os nomes registrados, as marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

06/2022 HB-3027-001 1127532PTBR © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.

