

Fevereiro de 2017

Ficha de protocolo do QIAasymphony® SP

circDNA_2000_DSP_V1 e
circDNA_4000_DSP_V1

Este documento é a ficha de protocolo do QIAasymphony circDNA_2000_DSP_V1 e
circDNA_4000_DSP_V1, versão 1, R1

Informações gerais

Para uso diagnóstico in vitro.

Este protocolo destina-se à purificação de DNA livre circulante de plasma humano e urina humana recém-coletados ou congelados utilizando o QIAasymphony SP e o kit QIAasymphony DSP Circulating DNA.

Kit	QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (n° de catálogo 937556)
Material de amostra	Plasma humano: EDTA ou citrato anticoagulado, ou ccfDNA estabilizado Urina humana: não estabilizada ou estabilizada
Nome do protocolo	circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1
Conjunto padrão de controle de teste	ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1
Volume de eluição	60 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0.3 ou superior

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Plasma humano (consulte "Preparation of sample material") e urina humana (estabilizada ou não estabilizada)
Volume de amostra	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com .
Tubos de amostra primários	n/a
Tubos de amostra secundários	Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com .
Introdutores	n/a
Outros	A proteinase K precisa ser adicionada à fenda A (posição 1 e/ou 2)

n/a = não aplicável.

Preparo da proteinase K na gaveta "Sample"

O kit QIASymphony DSP Circulating DNA contém solução de proteinase K pronta para uso que pode ser mantida à temperatura ambiente.

Nota: Os tubos que contêm proteinase K são colocados em um porta-tubo. Os tubos que contêm a proteinase K devem ser colocados nas posições 1 e/ou 2 na fenda A da gaveta "Sample". Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com.

Número de amostras*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11,660 ml†
96	11,660 ml	22,220 ml†

* Para cada amostra, são necessários 110 µl para circDNA_2000_DSP ou 220 µl para circDNA_4000_DSP, mais um volume morto adicional de 1100 µl [(n x 110 ou 220 µl) + 1100 µl].

† Para circDNA_4000_DSP: Se mais de 48 amostras forem processadas, utilize um segundo tubo. O volume de carga máximo por tubo é de 11,660 µl. Para o segundo tubo, é necessário um volume morto adicional de 1100 µl.

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e materiais de consumo)

Posição A1 e/ou A2	Cartucho de reagente
Posição B1	n/a
Suporte de rack para ponteiras, 1-18	Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl ou 1500 µl
Suporte de caixa unitárias, 1-4	Caixas unitárias com cartuchos de preparo de amostra ou tampas de 8 hastes

n/a = não aplicável.

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitárias, 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” (Eluato)

Rack de eluição (recomenda-se utilizar a fenda 1, na posição de resfriamento)

Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com.

Materiais plásticos necessários

Protocolo circDNA_2000_DSP

Materiais plásticos	Um lote 24 amostras*	Dois lotes 48 amostras*	Quatro lotes 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl^{†‡}	24	48	96
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl^{†‡}	64	120	232
Cartuchos de preparo de amostra[§]	15	30	60
Tampas de 8 hastes[¶]	3	6	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 inventariação (leitura de conteúdo).

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

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

Protocolo circDNA_4000_DSP

Materiais plásticos	Um lote 24 amostras*	Dois lotes 48 amostras*	Quatro lotes 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl ^{†‡}	104	200	392
Cartuchos de preparo de amostra [§]	18	36	72
Tampas de 8 hastes [¶]	3	6	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 inventariação (leitura de conteúdo).

[§] 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. Recomenda-se carregar o maior número possível de ponteiras.

Volume de eluição

Volume de eluição selecionado	Volume de eluição inicial
60 µl	75 µl

O volume de eluição é selecionado na tela sensível ao toque. O volume médio de eluição disponível é ≥ 60 µl. Em casos individuais, o volume de eluato final para amostras unitárias pode ser até 5 µl menor do que o volume selecionado (p. ex., 55 µl). Recomenda-se verificar o volume de eluato real ao utilizar um sistema automatizado de configuração de teste que não verifica o volume de eluato antes da transferência.

Armazenamento de eluatos

Recomenda-se remover a placa de eluato da gaveta "Eluate" imediatamente após o término da execução. As placas de eluição podem ser deixadas no QIASymphony SP após a conclusão da execução do teste durante a noite (máximo de 16 horas incluindo o tempo de execução; condições ambientais recomendadas:

18–26°C e umidade relativa de 20–75%). Dependendo da temperatura e umidade, o eluato pode sofrer condensação ou evaporação.

Após o preparo da amostra, os eluatos podem ser armazenados a 2–8°C por até 1 mês. Para um armazenamento de longo prazo, os eluatos podem ser mantidos a -20°C ou -80°C. Os eluatos congelados não devem ser descongelados mais de 3 vezes.

Preparo de material de amostra

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre utilize um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as nossas fichas de dados de segurança (SDSs) disponíveis com o fornecedor do produto.

Pontos importantes antes de iniciar

- Evite a formação de espuma dentro das amostras ou sobre elas.
- As amostras devem ser equilibradas à temperatura ambiente (15–25°C) antes de iniciar a operação.

Plasma humano

As amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante podem ser utilizadas para o preparo do plasma. O plasma preparado a partir dos tubos de coleta de sangue com ccfDNA estabilizado também pode ser utilizado. O plasma é gerado conforme especificado pelo fabricante.

Ao utilizar EDTA ou citrato como anticoagulante, recomenda-se conduzir a separação de plasma imediatamente após a doação de sangue.

Para determinadas aplicações a jusante, pode ser necessário excluir ou minimizar os ácidos nucleicos nas vesículas. Nestes casos, recomenda-se realizar um passo de centrifugação em alta velocidade a 16.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25°C) após a geração inicial do plasma.

Após a coleta e centrifugação, o plasma pode ser armazenado à temperatura ambiente por até 7 dias e a 2–8°C por até 14 dias. Para armazenamento prolongado, recomenda-se congelar as alíquotas a -20°C ou -80°C. O plasma congelado não deve ser descongelado mais de 3 vezes. Congelamento e descongelamento repetido gera desnaturação e precipitação de proteínas, resultando potencialmente em produção reduzida de ácidos nucleicos livres circulantes. Se os crioprecipitados ficarem visíveis nas amostras, centrifugue à 6.800 x g por 3 minutos à temperatura

ambiente (15–25°C) e transfira os sobrenadantes, sem agitar os péletes, para um tubo de amostra secundário (consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com). Inicie o procedimento de purificação imediatamente.

Urina humana

Devido à rápida degradação do DNA livre circulante após a coleta da urina, recomenda-se veemente a estabilização imediata das amostras de urina.

Urina humana estabilizada

A urina estabilizada pode ser conservada à temperatura ambiente (15–25°C) ou a 2–8°C por até 7 dias. Para armazenamento prolongado, recomenda-se congelar as alíquotas a -20°C ou -80°C.

As amostras de urina estabilizadas não necessitam de pré-tratamento de amostra. Após a estabilização, recomenda-se centrifugar as amostras de urina em baixa velocidade (1900 x g) por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25°C) para remover as células antes da extração do DNA livre circulante. Se os precipitados ficarem visíveis nos sobrenadantes após a centrifugação, aqueça as amostras até 25°C em banho-maria para dissolvê-los. Antes de iniciar a operação, transfira as amostras para um tubo de amostra secundário no porta-amostra (consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com).

Urina humana “não estabilizada”

Antes de iniciar um protocolo que exige tampão ATL, verifique se há formação de precipitado no tampão ATL. Se necessário, dissolva-o utilizando aquecimento a 70°C, agitando-o suavemente em banho-maria. Aspire as bolhas presentes na superfície do tampão ATL.

Nota: O tampão ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, n° de catálogo 939016) não está incluído no kit QIASymphony DSP Circulating DNA e deve ser encomendado separadamente.

Recomenda-se centrifugar as amostras de urina imediatamente após a coleta em baixa velocidade (1900 x g) por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25°C) para remover as células. As amostras de urina não estabilizadas necessitam de pré-tratamento de amostra.

Importante: Equilibre as amostras à temperatura ambiente (15–25°C) antes de iniciar o pré-tratamento.

Importante: Deve-se realizar a centrifugação e o pré-tratamento dentro de 4 horas após a coleta da amostra de urina.

- Misture 2500 µl de urina (circDNA_2000_DSP) ou 4500 µl de urina (circDNA_4000_DSP) com 250 µl ou 450 µl de tampão ATL, respectivamente.
- Incube as amostras à temperatura ambiente (15–25°C) por 1 hora.
- Centrifugue as amostras a 1900 x g por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25°C).
Se os precipitados ficarem visíveis nos sobrenadantes após a centrifugação, aqueça as amostras até 25°C em banho-maria para dissolver os precipitados.
- Transfira os supernadantes para um tubo de amostra secundário e, em seguida, carregue este tubo no porta-amostra (consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com).

Importante: A estabilidade e integridade do DNA livre circulante é limitada na urina não estabilizada. Recomenda-se carregar no máximo um lote de 24 amostras por execução de teste QIASymphony para minimizar o tempo das amostras de urina no equipamento.

Substâncias interferentes

As amostras de plasma com concentrações altas de gamaglobulina (> 30 g/l) podem causar uma recuperação reduzida do DNA livre circulante.

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

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcadas especificamente como tais, não devem ser considerados como não protegidos pela lei.
02/2017 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados.

