

Manual QIAamp DSP Virus Spin Kit



Versão 1



Para utilização em diagnóstico in vitro



61704



1062686PT



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,

ALEMANHA

R6



1062686PT



Tecnologias de amostragem e ensaio da QIAGEN

A QIAGEN é o principal fornecedor de tecnologias inovadoras de amostragem e ensaio, permitindo o isolamento e a detecção do conteúdo de qualquer amostra biológica. Os avançados produtos e serviços de elevada qualidade da nossa empresa garantem o sucesso desde a amostra ao resultado.

A QIAGEN é uma empresa de referência em matéria de:

- Purificação de ADN, ARN e proteínas
- Ensaio de ácidos nucleicos e proteínas
- Investigação em microARN e ARNi
- Automatização de tecnologias de amostragem e ensaio

A nossa missão permitir-lhe-á alcançar o sucesso, bem como resultados notáveis. Para obter mais informações, visite www.qiagen.com.

Índice

| | |
|--|-----------|
| Utilização prevista | 4 |
| Resumo e explicação | 4 |
| Princípios do procedimento | 4 |
| Purificação automática de ácidos nucleicos virais no QIAcube | 4 |
| Materiais fornecidos | 9 |
| Conteúdo do kit | 9 |
| Materiais necessários, mas não fornecidos | 10 |
| Avisos e precauções | 11 |
| Armazenamento e manuseamento de reagente | 13 |
| Armazenamento e manuseamento de amostras | 13 |
| Procedimento | 14 |
| Aspectos importantes antes do início do procedimento | 14 |
| Manuseamento das colunas QIAamp MinElute | 14 |
| Centrifugação | 15 |
| Processar colunas QIAamp MinElute numa microcentrífuga | 15 |
| Preparar reagentes e tampões | 15 |
| Protocolo: Purificação de ácidos nucleicos virais a partir de plasma ou de soro | 19 |
| Controlo de qualidade | 22 |
| Limitações | 22 |
| Características de desempenho | 22 |
| Referências | 22 |
| Símbolos | 23 |
| Informações de contacto | 24 |
| Apêndice | 25 |

Utilização prevista

O QIAamp DSP Virus Spin Kit é um sistema que usa a tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para o isolamento e a purificação de ácidos nucleicos virais de amostras biológicas.

O produto destina-se a utilizadores profissionais, tais como técnicos e médicos com formação em técnicas de biologia molecular.

O QIAamp DSP Virus Spin Kit foi concebido para aplicações de diagnóstico in vitro.

Resumo e explicação

O QIAamp DSP Virus Spin Kit usa uma tecnologia credível de purificação simultânea de ADN e ARN viral. O kit combina as propriedades de ligação selectiva de uma membrana à base de sílica com volumes flexíveis de eluição entre 20 e 150 µl. O procedimento é indicado para a utilização com plasma e soro. As amostras podem ser recém-colhidas ou congeladas, desde que não tenham sido congeladas e descongeladas mais de uma vez (ver página 13). Os ácidos nucleicos virais são eluídos em tampão AVE, prontos a ser utilizados em reacções de amplificação ou armazenados a uma temperatura de -25 °C a -15 °C.

Princípios do procedimento

O procedimento QIAamp DSP Virus Spin compreende 4 passos (lise, ligação, lavagem, eluição) e realiza-se usando colunas QIAamp MinElute® numa microcentrífuga standard ou de forma totalmente automatizada no QIAcube®. Este procedimento foi concebido para minimizar o potencial de contaminação cruzada de amostra para amostra e permite a manipulação segura de amostras potencialmente infecciosas. O procedimento QIAamp DSP Virus Spin simples é indicado para o processamento simultâneo de amostras múltiplas. O QIAamp DSP Virus Spin Kit pode ser usado para o isolamento de ARN e ADN virais de uma vasta gama de vírus de ADN e ARN. Contudo, as características de desempenho para cada espécie de vírus não foram estabelecidas e têm de ser validadas pelo utilizador.

Purificação automática de ácidos nucleicos virais no QIAcube

A purificação de ácidos nucleicos virais usando o QIAamp DSP Virus Spin Kit pode ser totalmente automatizada no QIAcube. O inovador QIAcube usa tecnologia avançada para processar colunas de rotação QIAGEN®, permitindo uma integração regular de uma preparação de amostras automatizada, de baixa produção, nos procedimentos de laboratório. A preparação de amostras com o QIAcube segue os mesmos passos do procedimento manual (ou seja,

lise, ligação, lavagem e eluição), permitindo-lhe usar o QIAamp DSP Virus Spin Kit para purificação de ácidos nucleicos virais de elevada qualidade.

Se o QIAamp DSP Virus Spin Kit for automatizado no instrumento QIAcube, o instrumento pode processar menos de 50 amostras devido a volumes mortos, evaporação e consumo adicional de reagente por pipetização automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparações de amostra com a utilização manual do QIAamp DSP Virus Spin.

Para mais informações sobre o procedimento automatizado, veja a folha de protocolo relevante disponível em www.qiagen.com/MyQIAcube. As folhas de protocolo actualizadas podem ser descarregadas gratuitamente ou então obtidas, contactando o departamento de assistência técnica da QIAGEN (ver pág. 22).



Fig. 1. O QIAcube.

Lise com protease QIAGEN

As amostras são lisadas em condições altamente desnaturantes a temperaturas elevadas. A lise é realizada na presença de protease QIAGEN e tampão AL, garantindo juntos a inactivação de RNases.

Adsorção para a membrana QIAamp MinElute

As condições de ligação são ajustáveis acrescentando etanol para permitir uma excelente ligação de ARN e ADN viral à membrana. Os lisados são, então, transferidos para uma coluna QIAamp MinElute e os ácidos nucleicos virais são adsorvidos para a membrana de gel de sílica à medida que o lisado é escoado por centrifugação. As condições de sal e de pH garantem que as proteínas e outros contaminantes que possam inibir o PCR e outras reacções enzimáticas a jusante não sejam retidos na membrana QIAamp MinElute.

Os tubos de lavagem de 2 ml (fornecidos) suportam a coluna QIAamp MinElute durante os passos de carregamento e de lavagem.

Remover contaminantes residuais

Os ácidos nucleicos permanecem ligados à membrana, enquanto os contaminantes são eficazmente lavados e removidos durante 3 passos de

lavagem. Num único passo, ARN e ADN e virais de elevada pureza são eluídos no tampão AVE, equilibrados à temperatura ambiente.

Eluição de ácidos nucleicos puros

A eluição é realizada com o tampão AVE. As colunas QIAamp MinElute permitem volumes de eluição mínimos de apenas 20 μ l. O baixo volume de eluição leva a eluatos de ácido nucleico altamente concentrados.

Para aplicações a jusante que precisem de volumes iniciais pequenos (por ex., alguns ensaios PCR e RT-PCR), um eluato mais concentrado pode aumentar a sensibilidade do ensaio.

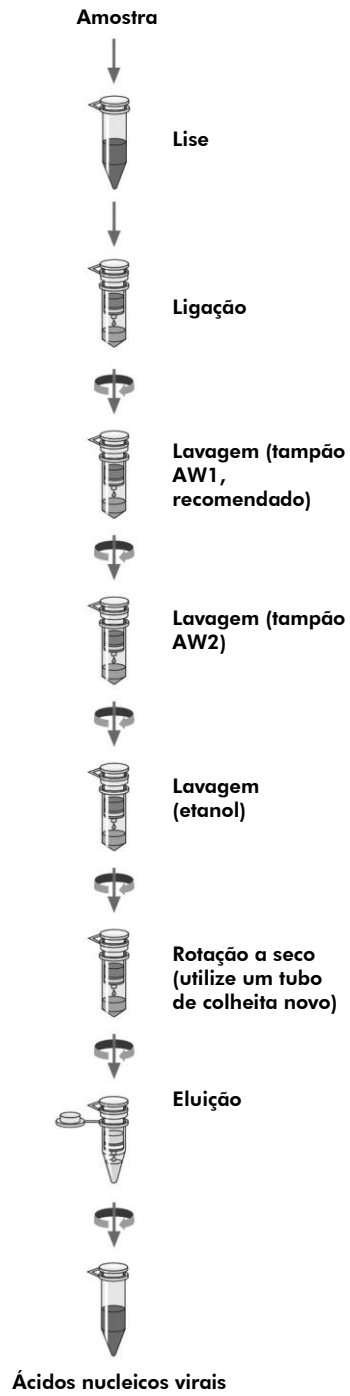
Para aplicações a jusante que precisem de volumes iniciais maiores, o volume de eluição pode ser aumentado até 150 μ l. Contudo, um aumento no volume de eluição baixa a concentração de ácidos nucleicos no eluato.

O volume de eluato recuperado pode ser até 5 μ l menos do que o volume do tampão de eluição aplicado à coluna; por exemplo, um volume de tampão de eluição de 20 μ l resulta em >15 μ l de eluato final. O volume de eluato recuperado depende da natureza da amostra.

O ácido nucleico eluído é colhido em tubos de eluição de 1,5 ml (ET, fornecidos). Recomenda-se o armazenamento de ADN ou ARN a -20°C .

Os rendimentos de ácido nucleico viral isolado de amostras biológicas situam-se, normalmente, abaixo de 1 μ g. São recomendados os métodos de amplificação quantitativa para a determinação de rendimentos. Ao quantificar os ácidos nucleicos isolados usando o protocolo QIAamp DSP Virus Spin, lembre-se de que haverá consideravelmente mais ARN transportador na amostra do que no ARN viral.

Procedimento QIAamp DSP Virus



Totalmente automatizável no QIAcube

ARN transportador

O ARN transportador serve para duas coisas. Primeiro, melhora a ligação dos ácidos nucleicos virais à membrana QIAamp, especialmente se houver muito poucas moléculas de destino na amostra. Segundo, a adição de grandes quantidades de ARN transportador reduz as hipóteses de uma degradação do ARN viral na eventualidade, rara, de as moléculas de RNases escaparem à desnaturação por sais caotrópicos e detergente no tampão AL. Se o ARN transportador não for acrescentado ao tampão AL, isso pode levar a uma recuperação reduzida de ARN e ADN virais.

A eficácia dos diferentes sistemas de amplificação varia em função da quantidade total de ácido nucleico presente na reacção. Os eluatos deste kit contêm ácidos nucleicos virais e ARN transportador, e as quantidades de ARN transportador irão exceder largamente as quantidades de ácidos nucleicos virais. Os cálculos sobre a quantidade de eluato a acrescentar a amplificações a jusante devem, por isso, basear-se na quantidade de ARN transportador acrescentado. Para obter os mais elevados níveis de sensibilidade em reacções de amplificação, pode ser necessário ajustar a quantidade de ARN transportador acrescentado ao tampão AL.









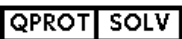



Adição de controlos internos

A utilização do protocolo QIAamp DSP Virus Spin em combinação com os sistemas de amplificação disponíveis no mercado pode carecer da introdução de um controlo interno no procedimento de purificação. O controlo interno de ARN ou ADN deve ser acrescentado ao ARN transportador no tampão de lise. Para uma excelente eficácia de purificação, as moléculas de controlo interno não podem ter mais de 200 nucleótidos, dado que as moléculas mais pequenas não são recuperadas eficazmente.

Consulte as instruções do fabricante a fim de determinar a concentração ideal. A utilização de uma concentração diferente da recomendada pode reduzir a eficácia da amplificação.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

| QIAamp DSP Virus Spin Kit | | | |
|---------------------------|--|--|-----------------|
| N.º de catálogo | | | 61704 |
| Número de preparações | | | 50 [§] |
| QIAamp MinElute | QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (WT) (Colunas QIAamp MinElute com tubos de lavagem) (2 ml) |  | 50 |
| LT | Lysis Tubes (Tubos de lise) (2 ml) |  | 50 |
| ET | Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml) |  | 50 |
| WT | Wash Tubes (Tubos de lavagem) (2 ml) |  | 5 x 50 |
| AL | Lysis Buffer* (Tampão de lise) |  | 33 ml |
| AW1 | Wash Buffer 1* (concentrate) (Tampão de lavagem 1 [concentrado]) |  | 19 ml |
| AW2 | Wash Buffer 2 [†] (concentrate) (Tampão de lavagem 2 [concentrado]) |  | 13 ml |
| AVE | Elution Buffer [†] (purple caps) (Tampão de eluição [tampas roxas]) |  | 4 x 2 ml |
| PS | Protease Solvent [†] (Solvente de protease) |  | 4,4 ml |
| Carrier | Carrier RNA (red caps) (ARN transportador [tampas vermelhas]) |  | 310 µg |
| QP | QIAGEN Protease [‡] (Protease QIAGEN) |  | 1 frasco |
| | Manual |  | 1 |

*Contém um sal caotrópico. Tome medidas de segurança adequadas e use luvas durante o manuseamento. Não compatível com desinfetantes contendo lixívia. Para obter mais informações, consulte a página 11.

[†] Contém azida de sódio como conservante.

[‡] Ver “Preparar reagentes e tampões”, pág. 15.

[§] Se o QIAamp DSP Virus Spin Kit for automatizado no instrumento QIAcube, o instrumento pode processar menos de 50 amostras devido a volumes mortos, evaporação e consumo adicional de reagente por pipetagem automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparações de amostra com a utilização manual do QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as Folhas de dados de segurança (SDSs) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

- Etanol (96–100 %)*
- Pipetas[†] e pontas de pipeta (para evitar contaminação cruzada, recomendamos veementemente o uso de pontas de pipeta com barreiras para aerossóis)
- Bloco de aquecimento[†] para a lise de amostras a 56 °C
- Microcentrífuga[†] (com rotor para tubos de 1,5 ml e 2 ml)
- Vórtice
- Para amostras <200 µl: solução de NaCl a 0,9 %

* Não use álcool desnaturado, que contém outras substâncias, como metanol ou metil-etil-cetona.

[†] Para garantir que as amostras são devidamente processadas segundo os procedimentos do QIAamp DSP Virus Spin Kit, recomendamos vivamente que os instrumentos (por ex., pipetas e blocos de aquecimento) sejam calibrados segundo as recomendações do fabricante.

Avisos e precauções

Para utilização em diagnóstico in vitro

Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, por favor consulte as folhas de dados de segurança (SDSs) adequadas. Estas estão disponíveis online no formato PDF, prático e compacto, no endereço www.qiagen.com/safety onde poderá encontrar, visualizar e imprimir as SDSs para cada kit da QIAGEN e respectivos componentes.



PRECAUÇÃO: NÃO adicione lixívia nem soluções ácidas directamente aos resíduos contendo tampão AL ou AW1.

Os tampões AL e AW1 contêm cloridrato de guanidina, que pode formar compostos altamente reactivos quando combinados com lixívia. Se for derramado líquido destes tampões, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpe a área afectada primeiro com detergente laboratorial e água, e depois com hipoclorito de sódio a 1 % (v/v).

Se os frascos de tampão estiverem danificados ou com fugas, use luvas e óculos de protecção ao eliminar os frascos, a fim de evitar ferimentos em si ou em terceiros.

A QIAGEN não testou os resíduos líquidos gerados pelo procedimento do QIAamp DSP Virus Spin quanto à existência de materiais infecciosos residuais. A contaminação dos resíduos líquidos com materiais infecciosos residuais é altamente improvável, mas não pode ser completamente excluída. Por conseguinte, os resíduos líquidos têm de ser considerados infecciosos e têm de ser manuseados e eliminados de acordo com os regulamentos de segurança locais.

As frases de risco e segurança que se seguem aplicam-se aos componentes do QIAamp DSP Virus Spin Kit:

As seguintes advertências de precaução e de perigo aplicam-se aos componentes do QIAamp DSP Virus Spin Kit:

Tampão AL



Contém cloridrato de guanidina; ácido maleico. Aviso! Pode ser nocivo por ingestão ou inalação. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Tampão AW1



Contém: cloridrato de guanidina. Aviso! Nocivo por ingestão ou inalação. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Eliminar o conteúdo/o recipiente em instalações aprovadas de tratamento de resíduos. Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Protease QIAGEN



Contém: subtilisina. Perigo! Causa irritação moderada da pele. Provoca lesões oculares graves. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. Eliminar o conteúdo/o recipiente em instalações aprovadas de tratamento de resíduos. Em caso de sintomas respiratórios: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. EM CASO DE INALAÇÃO: em caso de dificuldade respiratória, retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Usar proteção respiratória.

Armazenamento e manuseamento de reagente

As colunas QIAamp MinElute devem ser guardadas a 2–8 °C após a entrega.

Todos os tampões podem ser armazenados à temperatura ambiente (15–25 °C).

O ARN transportador liofilizado pode ser armazenado à temperatura ambiente (15–25 °C) até ao fim do prazo de validade impresso na caixa do kit. O ARN transportador só pode ser dissolvido em tampão AVE; o ARN transportador dissolvido deve ser acrescentado imediatamente ao tampão AL, tal como descrito na página 15. Esta solução deve ser preparada na hora, mantendo-se estável a 2–8 °C durante até 48 horas. As porções de ARN transportador não usadas dissolvidas em tampão AVE devem ser congeladas em alíquotas entre –30 e –15 °C.

A protease QIAGEN (QP) liofilizada pode ser armazenada à temperatura ambiente (15–25 °C) até ao fim prazo de validade no kit, sem afectar o desempenho.

A protease QIAGEN (QP) reconstituída em solvente de protease (PS) mantém-se estável até um ano quando armazenada a 2–8 °C, mas só até ao fim do prazo de validade do kit. Deve evitar-se manter a solução-mãe de protease QIAGEN à temperatura ambiente por períodos prolongados.

O tampão de lavagem reconstituído 1 (AW1) e o tampão de lavagem reconstituído 2 (AW2) mantém-se estável até 1 ano, desde que armazenado à temperatura ambiente (15–25 °C), mas só até ao fim do prazo de validade do kit indicado na caixa.

Armazenamento e manuseamento de amostras

Depois da colheita e da centrifugação, o plasma ou o soro podem ser armazenados a 2–8 °C durante até 6 horas. Para períodos de armazenamento de longa duração, recomenda-se o congelamento a –20 °C ou –80 °C em alíquotas. As amostras congeladas de plasma ou soro não podem ser descongeladas mais de uma vez. Os congelamentos e os descongelamentos repetidos provocam a desnaturação e a precipitação de proteínas, resultando em títulos virais reduzidos e, assim, em rendimentos reduzidos de ácidos nucleicos virais. Além disso, os crioprecipitados formados durante o congelamento e o descongelamento obstruem a membrana QIAamp MinElute. Se os crioprecipitados forem visíveis, podem ser peletizados por centrifugação a cerca de 6800x g, durante 3 minutos. O sobrenadante clarificado deve ser removido e processado imediatamente sem perturbar o pellet.

Procedimento

Aspectos importantes antes do início do procedimento

- Depois de receber o kit, verifique se os componentes do mesmo apresentam danos. Se as embalagens blistadas ou os frascos de tampão estiverem danificados, contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN. Em caso de derrame de líquido, consulte “Avisos e precauções” (página 11) Não utilize componentes de kit danificados, uma vez que isso poderá resultar num fraco desempenho do kit.
- Use sempre equipamento isento de RNase.
- Mude sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Para minimizar a contaminação cruzada, recomendamos a utilização de pontas de pipeta com barreira para aerossóis.
- Todos os passos de centrifugação são levados a cabo à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Use sempre luvas descartáveis e verifique regularmente se não estão contaminadas com material da amostra. Elimine as luvas contaminadas.
- Para minimizar a contaminação cruzada, abra apenas um tubo de cada vez.
- Não use componentes de outros kits com os kits que estiver a usar no momento, salvo se os números de lote forem idênticos.
- Evite a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Para garantir a segurança relativamente a material potencialmente infeccioso, recomendamos que trabalhe em condições de fluxo de ar laminar até as amostras serem lisadas.
- Este kit só deve ser usado por pessoal com formação em prática de laboratório em diagnóstico in vitro.

Manuseamento das colunas QIAamp MinElute

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as precauções seguidamente indicadas são necessárias quando se manipularem colunas QIAamp MinElute, a fim de evitar contaminação cruzada entre preparações de amostras:

- Aplique cuidadosamente a amostra ou a solução na coluna QIAamp MinElute. Pipete a amostra para dentro da coluna QIAamp MinElute sem molhar os bordos da coluna.
- Troque as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Recomendamos o uso de pontas de pipeta com barreiras para aerossóis.

- Evite tocar na membrana QIAamp MinElute com a ponta da pipeta.
- Depois de todos os passos de vórtice pulsado, centrifugue por instantes os tubos de microcentrifugação para remover as gotas do interior da tampa.
- Durante todo o procedimento, deve usar luvas. Em caso de contacto entre as luvas e a amostra, mude de luvas imediatamente.

Centrifugação

- Juntamente com o kit são fornecidos tubos de lavagem e eluição para todos os passos de centrifugação.
- A centrifugação das colunas QIAamp MinElute realiza-se a cerca de 6000x g, a fim de reduzir o ruído da centrífuga. A centrifugação de colunas QIAamp MinElute à velocidade máxima não afecta o rendimento de ADN, nem de ARN.
- Para a rotação a seco no final do procedimento de lavagem e para a eluição, a centrifugação deve ser feita à velocidade máxima.
- Todos os passos de centrifugação devem ser levados a cabo à temperatura ambiente (15–25 °C).

Processar colunas QIAamp MinElute numa microcentrífuga

- Feche a coluna QIAamp MinElute antes de a colocar na microcentrífuga. Centrifugue tal como descrito.
- Remova a coluna QIAamp MinElute e o tubo de lavagem da microcentrífuga.
- Coloque a coluna QIAamp MinElute num novo tubo de lavagem. Elimine o filtrado e o tubo de lavagem. Atenção que o filtrado pode conter resíduos perigosos e deve ser devidamente eliminado.
- Abra apenas uma coluna QIAamp MinElute de cada vez e tenha cautela para evitar a formação de aerossóis.

Para um processamento eficiente de amostras múltiplas em paralelo, recomendamos o enchimento de um suporte com tubos de lavagem, de forma a que as colunas QIAamp MinElute possam ser transferidas depois da centrifugação. Os tubos de lavagem usados contendo filtrado podem ser eliminados e os tubos de lavagem novos com colunas QIAamp MinElute podem ser colocados directamente na microcentrífuga.

Preparar reagentes e tampões

- Preparação do ARN

Ao preparar ARN viral, trabalhe rapidamente durante os passos manuais do procedimento e leia o apêndice na página 25 antes de começar.

■ Preparar protease QIAGEN

Acrescente todo o conteúdo do frasco contendo 4,4 ml de solvente de protease (PS) ao frasco de protease QIAGEN liofilizada (QP) e misture cuidadosamente. Para evitar a formação de espuma, misture invertendo o frasco várias vezes. Verifique se a protease QIAGEN (QP) está completamente dissolvida.



Não acrescente protease QIAGEN (QP) directamente no tampão AL.*

A protease QIAGEN (QP) reconstituída em solvente de protease (PS) mantém-se estável durante um ano quando armazenada a 2–8 °C, mas só até ao fim do prazo de validade do kit. Deve evitar-se manter a solução-mãe de protease QIAGEN à temperatura ambiente por períodos prolongados.

■ Acrescentar ARN transportador ao tampão AL*

Acrescente 310 µl de tampão AVE ao tubo contendo 310 µg de ARN transportador liofilizado, a fim de obter uma solução de 1 µg/µl. Dissolva bem o ARN transportador, divida-o em alíquotas de dimensões convenientes e armazene entre –25 °C e –15 °C. Não congele e descongele alíquotas de ARN transportador mais de 3 vezes.



O ARN transportador não se dissolve no tampão AL. Tem de ser dissolvido primeiro no tampão AVE e depois acrescentado ao tampão AL.

Calcule o volume de mistura de tampão AL e ARN transportador por lote de amostras, seleccionando o número de amostras a processar em simultâneo, a partir da tabela 1, página 17. Para números maiores de amostras, os volumes podem ser calculados usando o cálculo de amostras abaixo:

$$n \times 0,22 \text{ ml} = y \text{ ml}$$

$$y \text{ ml} \times 28 \text{ µl/ml} = z \text{ µl}$$

sendo que:

n = número de amostras a processar em simultâneo

y = volume calculado de tampão AL

z = volume de ARN transportador e tampão AVE a acrescentar ao tampão AL

* Contém sal caotrópico. Tome medidas de segurança adequadas para laboratório e use luvas durante o manuseamento. Não compatível com desinfetantes contendo lixívia. Consulte a página 11 para informações de segurança.

Misture suavemente, invertendo o tubo 10 vezes. Para evitar a formação de espuma, não agite no vórtice.

Tabela 1. Volumes (Vol.) de tampão AL e de mistura de ARN transportador e tampão AVE necessários para números específicos (n.º) de amostras para o procedimento QIAamp DSP Virus Spin

| N.º amostras | Vol. tampão AL (ml) | Vol. ARN transportador AVE (µl) | N.º amostras | Vol. tampão AL (ml) | Vol. ARN transportador AVE (µl) |
|--------------|---------------------|---------------------------------|--------------|---------------------|---------------------------------|
| 1 | 0,22 ml | 6,2 µl | 13 | 2,86 ml | 80,1 µl |
| 2 | 0,44 ml | 12,3 µl | 14 | 3,08 ml | 86,3 µl |
| 3 | 0,66 ml | 18,5 µl | 14 | 3,30 ml | 92,4 µl |
| 4 | 0,88 ml | 24,6 µl | 16 | 3,52 ml | 98,6 µl |
| 5 | 1,10 ml | 30,8 µl | 17 | 3,74 ml | 104,7 µl |
| 6 | 1,32 ml | 37,0 µl | 18 | 3,96 ml | 110,9 µl |
| 7 | 1,54 ml | 43,1 µl | 19 | 4,18 ml | 117,0 µl |
| 8 | 1,76 ml | 49,3 µl | 20 | 4,40 ml | 123,2 µl |
| 9 | 1,98 ml | 55,4 µl | 21 | 4,62 ml | 129,4 µl |
| 10 | 2,20 ml | 61,6 µl | 22 | 4,84 ml | 135,5 µl |
| 11 | 2,42 ml | 67,8 µl | 23 | 5,06 ml | 141,7 µl |
| 12 | 2,64 ml | 73,9 µl | 24 | 5,28 ml | 147,8 µl |



O procedimento de preparação de amostras está otimizado para 5,6 µg de ARN transportador por amostra. Caso se tenha demonstrado que menos ARN transportador é melhor para o seu sistema de amplificação, transfira a quantidade necessária de ARN transportador dissolvido para os tubos contendo tampão AL. Por cada micrograma de ARN transportador necessário por preparação, acrescente 5 µl de ARN transportador dissolvido em tampão AVE por mililitro de tampão AL. A utilização de menos de 5,6 µg de ARN transportador por amostra tem de ser validada para cada tipo de amostra e ensaio a jusante em particular.


Tampão AW1*

Acrescente 25 ml de etanol (96–100 %) num frasco com 19 ml de concentrado de tampão AW1, tal como descrito no frasco. Marque a caixa de verificação no rótulo, para indicar que foi acrescentado etanol. Armazene o tampão reconstituído AW1 à temperatura ambiente (15–25 °C). O tampão reconstituído AW1 mantém-se estável até um ano, desde que armazenado à temperatura ambiente, mas só até ao fim do prazo de validade do kit.

 Misture sempre tampão reconstituído AW1, agitando antes do procedimento.

Tampão AW2†

Acrescente 30 ml de etanol (96–100 %) num frasco com 13 ml de concentrado de tampão AW2, tal como descrito no frasco. Marque a caixa de verificação no rótulo, para indicar que foi acrescentado etanol. Armazene o tampão reconstituído AW2 à temperatura ambiente (15–25 °C). O tampão reconstituído AW2 mantém-se estável até um ano, desde que armazenado à temperatura ambiente, mas só até ao fim do prazo de validade do kit.

 Misture sempre tampão reconstituído AW2, agitando antes do procedimento.

Eluição dos ácidos nucleicos

O tampão de eluição deve ser equilibrado à temperatura ambiente antes de ser aplicado à coluna.

* Contém sal caotrópico. Tome medidas de segurança adequadas para laboratório e use luvas durante o manuseamento. Não compatível com desinfetantes contendo lixívia. Consulte a página 11 para informações de segurança.

† Contém azida de sódio como conservante.

Protocolo: Purificação de ácidos nucleicos virais a partir de plasma ou de soro

Este protocolo destina-se à purificação de ácidos nucleicos virais a partir de 200 µl de plasma ou de soro, usando o QIAamp DSP Virus Spin Kit e uma microcentrífuga. Para a purificação automatizada usando o QIAamp DSP Virus Spin Kit com o QIAcube, consulte o manual do utilizador QIAcube (*QIAcube User Manual*) e a folha de protocolo relevante.



Aspecto importante antes do início do procedimento

- Todos os passos de centrifugação são levados a cabo à temperatura ambiente (15–25 °C).



Outros aspectos importantes antes de iniciar o procedimento

- Equilibrar amostras à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Equilibrar um tampão AVE à temperatura ambiente para a eluição no passo 14.
- Regule um bloco de aquecimento para 56 °C ± 3 °C, para usar no passo 4.
- Garanta que os tampões AW1 e AW2 e a protease QIAGEN (QP) foram preparados segundo as instruções nas páginas 15–18.
- Acrescente ao tampão AL ARN transportador reconstituído no tampão AVE, segundo as instruções na página 15.

Procedimento

1. Pipete 25 µl de protease QIAGEN (QP) para um tubo de lise (LT).



Consulte “Preparar reagentes e tampões”, página 15, para informações sobre a ressuspensão de protease QIAGEN (QP) em solvente de protease (PS).

2. Acrescente 200 µl de plasma ou soro ao tubo de lise (LT).

Se o volume da amostra for inferior a 200 µl, acrescente o volume indicado de solução de cloreto de sódio a 0,9 % para obter um volume de protease e amostra até um total de 225 µl.

3. Acrescente 200 µl de tampão AL (contendo 28 µg/ml de ARN transportador). Feche a tampa e misture com vórtice pulsado, durante ≥15 segundos.

Para garantir uma lise eficaz, é fundamental que a amostra e o tampão AL fiquem bem misturados para obter uma solução homogénea.



Não acrescente protease QIAGEN (QP) directamente no tampão AL.

4. Incube a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos ± 1 minuto, num bloco de aquecimento.
5. Centrifugue, por instantes, o tubo de lise (LT), para remover gotas do interior da tampa.
6. Acrescente 250 μl de etanol (96–100 %) à amostra, feche a tampa e misture bem com vórtice pulsado, durante ≥ 15 segundos. Incube o lisado com o etanol, durante 5 minutos ± 30 segundos, à temperatura ambiente (15–25 $^{\circ}\text{C}$).



Se a temperatura ambiente for superior a 25 $^{\circ}\text{C}$, o etanol deve ser arrefecido em gelo antes de ser acrescentado ao lisado.

7. Centrifugue o tubo, durante breves instantes, para remover gotas do interior da tampa.
8. Aplique, cuidadosamente, todo o lisado do passo 7 na coluna QIAamp MinElute sem molhar os bordos. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000x g durante >1 minuto. Coloque a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem (WT) limpo de 2 ml e elimine o tubo de lavagem com o filtrado.

Se o lisado não tiver passado completamente pela coluna depois da centrifugação, volte a centrifugar a maior velocidade, até a coluna QIAamp MinElute ficar vazia.

9. Abra, com cuidado, a coluna QIAamp MinElute e acrescente 500 μl de tampão AW1, sem molhar os bordos. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000x g durante ≥ 1 minuto. Coloque a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem (WT) limpo de 2 ml e elimine o tubo de lavagem com o filtrado.
10. Abra, com cuidado, a coluna QIAamp MinElute e acrescente 500 μl de tampão AW2 sem molhar os bordos. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000x g durante >1 minuto. Coloque a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem limpo de 2 ml e elimine o tubo de lavagem com o filtrado.
11. Abra, com cuidado, a coluna QIAamp MinElute e acrescente 500 μl de etanol (96–100 %) sem molhar os bordos. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000x g durante >1 minuto. Elimine o tubo de lavagem com o filtrado.

O “carry-over” de etanol para dentro do eluato pode causar problemas em aplicações a jusante. Alguns rotores de centrífuga podem vibrar ao

desacelerar, fazendo com que o produto residual, que contém etanol, entre em contacto com a coluna QIAamp MinElute. Retirar a coluna QIAamp MinElute e o tubo de lavagem do rotor também pode fazer com que o produto residual entre em contacto com a coluna QIAamp MinElute.

- 12. Coloque a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem (WT) limpo de 2 ml. Centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20 000x g), durante 3 minutos \pm 30 segundos para secar completamente a membrana.**
- 13. Coloque a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem novo de 2 ml (WT), abra a tampa e incube o conjunto a 56 °C \pm 3 °C, durante 3 minutos \pm 30 segundos, para secar completamente a membrana.**
Este passo serve para evaporar algum líquido que reste.
- 14. Coloque a coluna QIAamp MinElute num tubo de eluição (ET) e elimine o tubo de lavagem com o filtrado. Abra, com cuidado, a tampa da coluna QIAamp MinElute e aplique 20–150 μ l de tampão AVE no centro da membrana. Feche a tampa e incube à temperatura ambiente durante 5 minutos. Centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20 000x g), durante >1 minuto.**



Garanta que o tampão de eluição está equilibrado à temperatura ambiente. Se a eluição for feita em volumes pequenos (<50 μ l), o tampão de eluição tem de ser dispensado para o centro da membrana para eluição completa da ligação de ARN e ADN.

O volume de eluição é flexível e pode ser adaptado segundo os requisitos da aplicação a jusante. Lembre-se de que o volume de eluato recuperado será, aproximadamente, 5 μ l inferior ao volume do tampão de eluição aplicado na coluna.

Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade Total da QIAGEN, certificado pela norma ISO, todos os lotes do QIAamp DSP Virus Spin Kit são testados face a especificações predeterminadas, para garantir uma qualidade constante do produto.

Limitações

O desempenho do sistema foi estabelecido usando amostras de plasma e de soro para o isolamento de ácidos nucleicos virais.

É da responsabilidade do utilizador validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório, que não estejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, devem ser utilizados os controlos adequados para aplicações a jusante. Para uma validação mais aprofundada, são recomendadas as directrizes da International Conference on Harmonisation of Technical Requirements (Conferência Internacional para a Harmonização dos Requisitos Técnicos - ICH) descritas em ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures (Validação de Procedimentos Analíticos): São recomendados o Texto e a Metodologia.

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados juntamente com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

Características de desempenho

Consulte www.qiagen.com/goto/QIAampDSPVirusSpinPerformance para as características de desempenho do QIAamp DSP Virus Spin Kit.

Referências

A QIAGEN mantém uma abrangente base de dados online actualizada de publicações científicas que utilizam produtos QIAGEN. As opções de pesquisa avançada permitem localizar os artigos de que necessita, quer através da pesquisa por uma única palavra-chave, quer especificando a aplicação, área de investigação, título, etc.

Para obter uma lista completa de referências, visite a base de dados de referências da QIAGEN online em www.qiagen.com/RefDB/search.asp ou contacte a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN.

Símbolos



Contém reagentes suficientes para <N> preparações de amostra



Consulte as instruções de utilização



Prazo de validade



Dispositivo médico para diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Nota importante



Número de lote



Número do material



Componentes



Volume



Limites de temperatura



Fabricante



Após a entrega



Abrir no ato da entrega; armazenar as colunas QIAamp MinElute a 2–8 °C



Anotar a data atual depois de adicionar etanol ao frasco



Adição



Contém

| | |
|--------------------|------------------------------------|
| LYOPH | Liofilizado |
| RCNS | Reconstituir em |
| EtOH | Etanol |
| GuHCl | Cloridrato de guanidina |
| MALEIC ACID | Acido maleico |
| SUBT | Subtilisina |
| GTIN | Número do item de comércio mundial |
| → | Conduz a |

Informações de contacto

Na QIAGEN, orgulhamo-nos da qualidade e da disponibilidade do nosso suporte técnico. Os nossos departamentos de assistência técnica são compostos por cientistas experientes com conhecimentos práticos e teóricos abrangentes em tecnologias de amostragem e ensaio e utilização dos produtos QIAGEN. Se tiver alguma dúvida ou dificuldade em relação ao QIAamp DSP Virus Spin Kit ou aos produtos QIAGEN de um modo geral, não hesite em contactar-nos.

Os clientes da QIAGEN são a principal fonte de informação no que diz respeito às utilizações avançadas ou especializadas dos nossos produtos. Estas informações são úteis a outros cientistas, bem como aos investigadores da QIAGEN. Por conseguinte, incentivamo-lo a contactar-nos caso tenha alguma sugestão acerca do desempenho dos produtos ou de novas aplicações e técnicas.

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support ou contacte um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte o verso do manual ou visite www.qiagen.com).

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden, Alemanha

Apêndice

Manipulação do ARN

As ribonucleases (RNases) são enzimas extremamente estáveis e activas, que, habitualmente, não necessitam de co-factores para actuar. Dado que as RNases são difíceis de inactivar, e quantidades mínimas apenas são suficientes para destruir o ARN, não use qualquer artigo de plástico ou de vidro sem eliminar primeiro uma possível contaminação por RNase. É preciso ter cautela para evitar introduzir acidentalmente RNases na amostra de ARN durante ou após o procedimento de isolamento. Para criar e manter um ambiente livre de RNases, enquanto se trabalha com o ARN, devem tomar-se as seguintes precauções durante o pré-tratamento e utilização de recipientes descartáveis e não descartáveis e soluções.

Manuseamento geral

Ao trabalhar com o ARN, deve usar-se sempre uma técnica microbiológica adequada e asséptica. As mãos e partículas de pó podem transportar bactérias e fungos, sendo as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Use sempre luvas de látex ou vinilo quando manipular os reagentes e as amostras de ARN, para prevenir a contaminação por RNase a partir da superfície da pele ou de equipamento de laboratório com poeira. Mude frequentemente de luvas e mantenha os tubos fechados.

Material de plástico não descartável

O material de plástico não descartável deve ser tratado antes da utilização, para garantir que fica isento de RNase. O material de plástico deve ser cuidadosamente enxaguado com 0,1 M NaOH,* 1 mM EDTA* seguido de água isenta de RNase* (consulte as "Soluções", página 26). Em alternativa, o material de plástico resistente a clorofórmio pode ser enxaguado com clorofórmio* para inactivar RNases.

Material de vidro

O material de vidro deve ser tratado antes da utilização para garantir que fica isento de RNase. Antes da utilização, o material de vidro usado para trabalhar com ARN deve ser limpo com detergente, bem enxaguado e aquecido no forno a $>240\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante quatro horas ou mais (de um dia para o outro, se for mais conveniente). A autoclavagem por si só não inactiva por completo muitas

* Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as Folhas de dados de segurança (SDSs) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

RNases. O aquecimento no forno inactiva as ribonucleases e assegura que não ficam outros ácidos nucleicos (como seja ADN do plasmídeo) na superfície do material de vidro. Em alternativa, o material de vidro pode ser tratado com DEPC* (pirocarbonato de dietilo). Cubra o material de vidro com DEPC a 0,1% em água, de um dia para o outro (12 horas), a 37 °C, e depois autoclave ou aqueça a 100 °C durante 15 minutos, para remover DEPC residual.

i Os tubos Corex® devem ser isentados de RNase mediante tratamento com DEPC e não por aquecimento. Isto irá reduzir a taxa de insucesso deste tipo de tubo durante a centrifugação.

Tanques de electroforese

Os tanques de electroforese devem ser limpos com solução detergente (por ex., SDS a 0,5 %),* enxaguados com água, secos com etanol,*[†] e enchidos com uma solução de peróxido de hidrogénio* a 3 %. Depois de 10 minutos à temperatura ambiente, os tanques de electroforese devem ser bem enxaguados com água isenta de RNase.

Soluções

As soluções (água e outras soluções) devem ser tratadas com DEPC a 0,1%. O DEPC reage com aminas primárias e não pode ser usado directamente para tratar tampões Tris. O DEPC é altamente instável na presença de tampões Tris e decompõe-se rapidamente em etanol e CO₂. Ao preparar os tampões Tris, trate a água com DEPC primeiro e depois dissolva o Tris para criar o tampão certo.

DEPC é um inibidor forte, mas não absoluto, de RNases. É normalmente usado numa concentração de 0,1% para inactivar RNases em vidro ou plástico ou para criar soluções e água isentas de RNase. O DEPC inactiva RNases através de modificação covalente. Quantidades vestigiais de DEPC irão modificar resíduos de purina no ARN por carbo-etoxilação. O ARN carbo-etoxilado é transposto, com uma eficácia muito baixa, para sistemas isentos de células. Contudo, a sua capacidade para formar híbridos de ADN:ARN ou ARN:ARN não é seriamente afectada, a menos que uma parcela considerável dos resíduos de purina tenha sido modificada. O DEPC residual tem de ser sempre removido de soluções ou recipientes por meio de autoclave ou aquecimento a 100 °C ± 3 °C, durante 15 minutos ± 1 minuto.

* Quando trabalhar com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as Folhas de dados de segurança (SDSs) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

[†] Os plásticos usados para alguns tanques de electroforese não são resistentes ao etanol. Tome as devidas precauções e verifique as instruções do fornecedor.

Acrescente 0,1 ml de DEPC a 100 ml da solução a ser tratada e agite vigorosamente para transformar o DEPC em solução ou deixe a solução incubar durante >12 horas a $37\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Autoclave durante 15 minutos ± 1 minuto para remover qualquer vestígio de DEPC. Poderá ser desejável testar fontes de água quanto à presença de RNases contaminantes, dado que muitas fontes de água destilada são isentas de actividade de RNase.

① Os tampões do QIAamp DSP Virus Spin Kit não são isentados de RNase por tratamento com DEPC, estando, por isso, livres de qualquer contaminação com DEPC.

Marcas registadas: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute® (QIAGEN Group); Corex® (Corning, Inc.).

Os nomes registados, as marcas comerciais, etc. usados neste documento, mesmo sem menção específica como tal, não devem ser considerados como não tendo protecção legal.

Acordo de licença limitada para QIAamp DSP Virus Spin Kit

A utilização deste produto implica a concordância por parte de qualquer comprador ou utilizador do QIAamp DSP Virus Spin Kit com os seguintes termos:

1. O QIAamp DSP Virus Spin Kit pode ser usado somente de acordo com o *Manual QIAamp DSP Virus Spin Kit* e apenas para utilização com os componentes contidos no kit. A QIAGEN não concede qualquer licença ao abrigo de sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes englobados neste kit em qualquer componente não incluído neste kit, excepto conforme descrito no *Manual QIAamp DSP Virus Spin Kit* e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com.
2. À excepção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não emite qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringem os direitos de terceiros.
3. Este kit e os seus componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, renovados ou ser objecto de revenda.
4. A QIAGEN recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à excepção das expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador do kit concorda em não tomar nem permitir que qualquer outro tome medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos actos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições deste Acordo de Licença Limitada em qualquer Tribunal e irá recuperar todos os seus custos legais e de investigação, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir este Acordo de Licença Limitada ou qualquer dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

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

© 2015 QIAGEN, todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ Orders 1-800-243-800 ■ Fax 03-9840-9888 ■ Technical 1-800-243-066

Austria ■ Orders 0800-28-10-10 ■ Fax 0800-28-10-19 ■ Technical 0800-28-10-11

Belgium ■ Orders 0800-79612 ■ Fax 0800-79611 ■ Technical 0800-79556

Brazil ■ Orders 0800-557779 ■ Fax 55-11-5079-4001 ■ Technical 0800-557779

Canada ■ Orders 800-572-9613 ■ Fax 800-713-5951 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

China ■ Orders 86-21-3865-3865 ■ Fax 86-21-3865-3965 ■ Technical 800-988-0325

Denmark ■ Orders 80-885945 ■ Fax 80-885944 ■ Technical 80-885942

Finland ■ Orders 0800-914416 ■ Fax 0800-914415 ■ Technical 0800-914413

France ■ Orders 01-60-920-926 ■ Fax 01-60-920-925 ■ Technical 01-60-920-930 ■ Offers 01-60-920-928

Germany ■ Orders 02103-29-12000 ■ Fax 02103-29-22000 ■ Technical 02103-29-12400

Hong Kong ■ Orders 800 933 965 ■ Fax 800 930 439 ■ Technical 800 930 425

Ireland ■ Orders 1800 555 049 ■ Fax 1800 555 048 ■ Technical 1800 555 061

Italy ■ Orders 800-789-544 ■ Fax 02-334304-826 ■ Technical 800-787980

Japan ■ Telephone 03-6890-7300 ■ Fax 03-5547-0818 ■ Technical 03-6890-7300

Korea (South) ■ Orders 080-000-7146 ■ Fax 02-2626-5703 ■ Technical 080-000-7145

Luxembourg ■ Orders 8002-2076 ■ Fax 8002-2073 ■ Technical 8002-2067

Mexico ■ Orders 01-800-7742-639 ■ Fax 01-800-1122-330 ■ Technical 01-800-7742-436

The Netherlands ■ Orders 0800-0229592 ■ Fax 0800-0229593 ■ Technical 0800-0229602

Norway ■ Orders 800-18859 ■ Fax 800-18817 ■ Technical 800-18712

Singapore ■ Orders 1800-742-4362 ■ Fax 65-6854-8184 ■ Technical 1800-742-4368

Spain ■ Orders 91-630-7050 ■ Fax 91-630-5145 ■ Technical 91-630-7050

Sweden ■ Orders 020-790282 ■ Fax 020-790582 ■ Technical 020-798328

Switzerland ■ Orders 055-254-22-11 ■ Fax 055-254-22-13 ■ Technical 055-254-22-12

UK ■ Orders 01293-422-911 ■ Fax 01293-422-922 ■ Technical 01293-422-999

USA ■ Orders 800-426-8157 ■ Fax 800-718-2056 ■ Technical 800-DNA-PREP (800-362-7737)

