

Janeiro de 2020

Manual do PAXgene[®] Blood RNA Kit

Versão 2



50 (ref.º 762174)

R3 **MAT** 1120409PT

REF 762174



PreAnalytiX GmbH
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon
Produzido por QIAGEN GmbH para a PreAnalytiX

 **PreAnalytiX**
A QIAGEN / BD Company

Marcas comerciais: PAXgene®, PreAnalytiX™ (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube® (Grupo QIAGEN); BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Os PAXgene Blood RNA Kits não estão disponíveis em todos os países; por favor informe-se.

Contrato de licença limitada

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do PAXgene Blood RNA Kit:

1. O PAXgene Blood RNA Kit só pode ser usado de acordo com o *Manual do PAXgene Blood RNA Kit* e apenas para utilização com os componentes contidos no kit. A PreAnalytiX não concede qualquer licença ao abrigo da sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do PAXgene Blood RNA Kit* e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.PreAnalytiX.com.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a PreAnalytiX não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringem os direitos de terceiros.
3. Este kit e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, recondicionados ou objeto de revenda.
4. A PreAnalytiX recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer um dos atos acima proibidos.
6. A PreAnalytiX pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de licença limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todos os custos legais e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de licença limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou seus componentes.

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

Venda condicional

O presente produto é fornecido com uma licença ao abrigo de determinados pedidos de patentes, como sejam US-7,270,953 e US-7,682,790 dos Estados Unidos, assim como EP-1820793 B1 e equivalentes estrangeiras destes pedidos de patentes, para utilizar o produto no processamento do complexo de ácido nucleico formado durante a colheita de amostras num PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-006 BD-8945 1120409 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, todos os direitos reservados.

PreAnalytiX Company

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Suíça

www.preanalytix.com

Distribuidores da PreAnalytiX

Os produtos PreAnalytiX são fabricados para a PreAnalytiX pela QIAGEN ou BD e são distribuídos para a PreAnalytiX pela QIAGEN ou BD. Não é possível encomendar produtos à PreAnalytiX GmbH.

Por favor, consulte a última página para informações de contacto do seu distribuidor local da PreAnalytiX.

Índice

Conteúdo do kit.....	5
Símbolos.....	7
Condições de armazenamento	8
Utilização prevista	9
Limitações de utilização do produto	9
Controlo da qualidade	10
Assistência técnica	10
Informações de segurança	10
Introdução	14
Princípio e procedimento.....	14
Colheita e estabilização da amostra.....	15
Concentração e purificação do ARN	20
Purificação manual de ARN.....	20
Purificação automatizada de ARN.....	30
Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador	36
Notas importantes	38
Utilizar o QIAcube	38
Iniciar o QIAcube.....	38
Instalar protocolos no QIAcube	38
Carregar o QIAcube.....	40
Protocolo: Purificação manual do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....	49

Protocolo: Purificação automatizada do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 56

Guia de resolução de problemas..... 63

Apêndice A: Observações genéricas sobre a manipulação do ARN..... 65

Apêndice B: Quantificação e determinação da qualidade do ARN total 66

Apêndice C: Manipulação dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) 67

Informações para encomendas..... 69

Histórico de revisões do documento 71


Conteúdo do kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Ref.ª			762174
Número de preparações			50
BR1	Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)	RES BUF	20 ml
BR2	Binding Buffer (Tampão de ligação) *	BIND BUF	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1) *	WASH BUF 1	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (concentrate) (Tampão de lavagem 2 [concentrado]) †	WASH BUF 2 CONC	11 ml
BR5	Elution Buffer (Tampão de eluição)	ELU BUF	6 ml
RNFW	RNase-free Water (bottle) (Água livre de RNase [frasco])	PEL WASH	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (tampa verde)	PROTK	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (red) (Colunas de rotação PAXgene RNA [vermelho])	PAXgene RNA COL	5 × 10
PT	Processing Tubes (Tubos de processamento) (2 ml)	PROC TUBE	6 × 50
Hemogard	Secondary BD Hemogard™ Closures (Tampas secundárias BD Hemogard™)	SEC CLOS	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (1.5 ml) (Tubos de microcentrifugação [1,5 ml])	MIC TUBE	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (lyophilized) (DNase I, livre de RNase [liofilizada])	DNA REM	1500 unidades de Kunitz‡

*Não compatível com reagentes de desinfecção que contenham lixívia. Contém um sal de guanidina. Consulte Informações de segurança na página 10.

† O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

‡ As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento de A_{260} de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com o ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
Ref.º			762174
Número de preparações			50
RDD	DNA Digestion Buffer (white lid) (Tampão de digestão de ADN [tampa branca])	DNA DIG BUF	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Tampão de ressuspensão de DNase [tubo, tampa lilás])	DNase RES BUF	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Colunas de rotação PAXgene Shredder [lilás])	PAXgene SHRED COL	5 × 10
Manual	Manual do PAXgene Blood RNA Kit (Versão 2)		1

Símbolos



Contém reagentes suficientes para <N> testes



Consultar as instruções de utilização



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Referência



Número de lote



Número do material



Componentes



Número



Método de esterilização através de radiação



Unidades de Kunitz



Adicionar



Conteúdo



Reconstituído



Desoxirribonuclease I



Etanol

	Isotiocianato de guanidina
	RNase-Free DNase Set
	Número global de item comercial
	Não reutilizar
	Limites de temperatura
	Limite superior de temperatura
	Fabricante
	Nota importante
	Anotar a data atual depois de adicionar etanol ao frasco
	Após a entrega
	Resulta em

Condições de armazenamento

As colunas de rotação PAXgene RNA (PRC), as colunas de rotação PAXgene Shredder (PSC), a proteinase K (PK) e os tampões (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) podem ser armazenados secos à temperatura indicada no rótulo do kit.

O RNase-Free DNase Set, que contém DNase I (RNFD), tampão de digestão de ADN (RDD) e tampão de ressuspensão de DNase (DRB), é transportado à temperatura ambiente. Armazene todos os componentes do RNase-Free DNase Set imediatamente após a receção,

à temperatura indicada no rótulo. Quando armazenado adequadamente, o kit mantém-se estável até ao prazo de validade impresso na caixa do kit.

Utilização prevista

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação de ARN intracelular de sangue total humano colhido no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Quando o kit é utilizado em conjunto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sistema fornece ARN intracelular purificado de sangue total para a RT-PCR utilizada em testes de diagnóstico molecular. Consulte o Manual do PAXgene Blood RNA Tube (*PAXgene Blood RNA Tube Handbook*) para obter informações sobre a utilização dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System apenas foram estabelecidas com os transcritos dos genes FOS e IL1B. O utilizador é responsável por estabelecer características de desempenho adequadas do PAXgene Blood RNA System para outros transcritos-alvo.

Limitações de utilização do produto

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação de ARN intracelular do sangue total humano ($4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$ leucócitos/ml) para aplicações de diagnóstico in vitro. Não se destina à purificação de ADN genómico nem de ácidos nucleicos virais a partir de sangue total humano. Dado o número limitado de transcritos validados para as especificações de estabilização (transcritos dos genes FOS e IL1B), não é possível estabelecer características de desempenho para todos os transcritos. O pessoal do laboratório deve proceder à revisão dos dados do fabricante e dos seus próprios dados para determinar se é necessária validação para outros transcritos.

O produto destina-se a utilizadores profissionais, tais como técnicos e médicos com formação em procedimentos de diagnóstico in vitro.

Controlo da qualidade

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

Assistência técnica

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 vastos conhecimentos práticos e teóricos em biologia molecular e na utilização de produtos PreAnalytiX. Em caso de dúvidas relativamente ao PAXgene Blood RNA Kit, contacte-nos.

Para obter assistência técnica e mais informações, contacte a Assistência Técnica da QIAGEN.

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção.

Para minimizar o risco de infeção (por exemplo, por vírus VIH ou da hepatite B) ou lesões durante o trabalho com materiais biológicos e químicos, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online em formato PDF prático e compacto através do site **www.preanalytix.com** onde pode procurar, visualizar e imprimir as FDS para este kit.

ATENÇÃO

NÃO adicione lixívia nem soluções ácidas diretamente aos resíduos provenientes da preparação de amostras.

O tampão de ligação (BR2) e o tampão de lavagem 1 (BR3) contêm tiocianato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando combinado com lixívia. Se o tampão de ligação (BR2) ou o tampão de lavagem 1 (BR3) forem derramados, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se for derramado líquido com agentes potencialmente infecciosos, limpe a área afetada primeiro com detergente laboratorial e água e depois com hipoclorito de sódio a 1% (v/v).

A mistura da solução de estabilização do ARN e sangue do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pode ser desinfetada usando 1 volume de solução comercial de lixívia (hipoclorito de sódio a 5%) em 9 volumes da mistura da solução de estabilização do ARN e sangue.

Os resíduos resultantes da preparação da amostra, tais como sobrenadantes resultantes dos passos de centrifugação no procedimento de purificação do ARN, devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Antes de os eliminar, os resíduos devem ser esterilizados em autoclave ou incinerados para destruir qualquer material infeccioso. A eliminação deve ser feita de acordo com os regulamentos oficiais.

As frases que se seguem, de perigo e precaução, aplicam-se aos componentes do PAXgene Blood RNA Kit. Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações de segurança sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

Tampão BR2



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo por ingestão. Pode ser prejudicial em contacto com a pele e se inalado. Provoca lesões oculares graves. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retirá-las, se tal for possível. Continuar a enxaguar. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

Tampão BR3



Contém: etanol, tiocianato de guanidina. Perigo! Líquido e vapor inflamáveis. Provoca lesões oculares graves. O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico. Manter afastado de calor/faíscas/chamas a descoberto/superfícies quentes. Não fumar. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retirá-las, se tal for possível. Continuar a enxaguar. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

DNase I



Contém: DNase. Perigo! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Evitar respirar pós/fumos/gases/vapores/névoas. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Usar proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

Proteinase K



Contém: proteinase K. Perigo! Provoca uma ligeira irritação da pele. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Evitar respirar pós/fumos/gases/vapores/névoas. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Usar proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

Introdução

A colheita de sangue total constitui o primeiro passo em muitos ensaios moleculares utilizados para estudar o ARN celular. No entanto, um importante problema nestas experiências consiste na instabilidade do perfil do ARN celular *in vitro*. Os estudos efetuados pela PreAnalytiX mostraram que o número de cópias das espécies individuais de ARNm em sangue total se pode alterar mais de 1000 vezes durante o armazenamento ou transporte à temperatura ambiente.* Tal é provocado pela rápida degradação do ARN e pela expressão induzida de alguns genes depois da colheita do sangue. Estas alterações do perfil do ARN tornam impossível a realização de estudos fiáveis da expressão génica. Por conseguinte, torna-se essencial um método que conserve o perfil de expressão do ARN durante e depois da flebotomia para permitir uma análise rigorosa da expressão génica no sangue total humano.

Princípio e procedimento

A PreAnalytiX desenvolveu um novo sistema que permite a colheita, estabilização, armazenamento e transporte de amostras de sangue total humano com um protocolo rápido e eficiente para a purificação de ARN intracelular. O sistema requer a utilização dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patentes dos EUA 6,602,718 e 6,617,170) para a colheita de sangue e estabilização do ARN, seguida pela purificação manual ou automatizada de ARN utilizando o PAXgene Blood RNA Kit. Os protocolos manual e automatizado proporcionam um desempenho substancialmente equivalente no que se refere à qualidade e rendimento de ARN. Neste manual, estão incluídos os dados de desempenho para o protocolo manual (páginas 23–30) e protocolo automatizado (páginas 33–35).

* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. **48**, 1883.

Colheita e estabilização da amostra

Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contêm uma composição de reagentes proprietária, baseada numa tecnologia de estabilização do ARN patenteada. Este reagente protege as moléculas de ARN da degradação por RNases e reduz as modificações ex-vivo da expressão génica ao mínimo. Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) destinam-se à colheita de sangue total humano e estabilização de ARN celular durante até 3 dias a 18–25 °C (Figuras 1 e 2, páginas 16 e 17) ou até 5 dias a 2–8 °C (Figuras 3 e 4, páginas 18 e 19). Os dados atualmente disponíveis mostram estabilização do ARN celular durante um período mínimo de 11 anos a –20 °C ou –70 °C*. Para obter mais informações provenientes de estudos em curso que avaliam a estabilidade durante períodos de tempo mais longos, contacte a Assistência Técnica da QIAGEN.

A duração real da estabilização do ARN pode variar, dependendo da espécie de ARN celular e da aplicação a jusante utilizada. Dado o número limitado de transcritos validados para as especificações de estabilização (transcritos dos genes FOS e IL1B), não é possível estabelecer características de desempenho para todos os transcritos. O pessoal do laboratório deve proceder à revisão dos dados do fabricante e dos seus próprios dados para determinar se é necessária validação para outros transcritos.

* Está em curso um estudo de longa duração sobre a conservação de sangue em PAXgene Blood RNA Tubes.

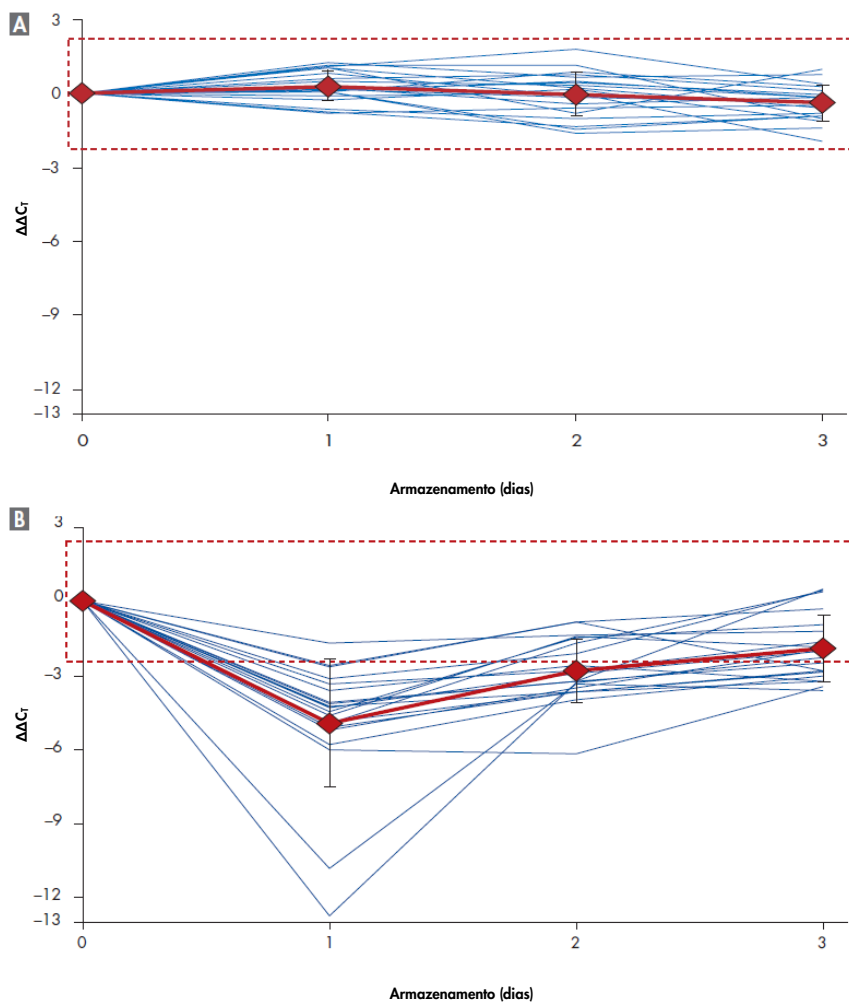


Figura 1. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 18–25 °C: FOS. Foi colhido sangue a 10 doadores, com amostras duplicadas e armazenadas a 18–25 °C durante o número de dias indicado, seguido por purificação do ARN total. **[A]** Procedeu-se à colheita de sangue, que foi armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e o ARN total foi purificado usando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi colhido e armazenado em tubos para colheita de sangue padrão com EDTA como anticoagulante e o ARN total foi purificado com um método de extração padrão com solvente orgânico que inclui a limpeza do ARN baseada em membrana de gel de silício. Os níveis de transcrição relativos ao FOS foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total $\pm 3 \times$ do ensaio (2,34 C_t).

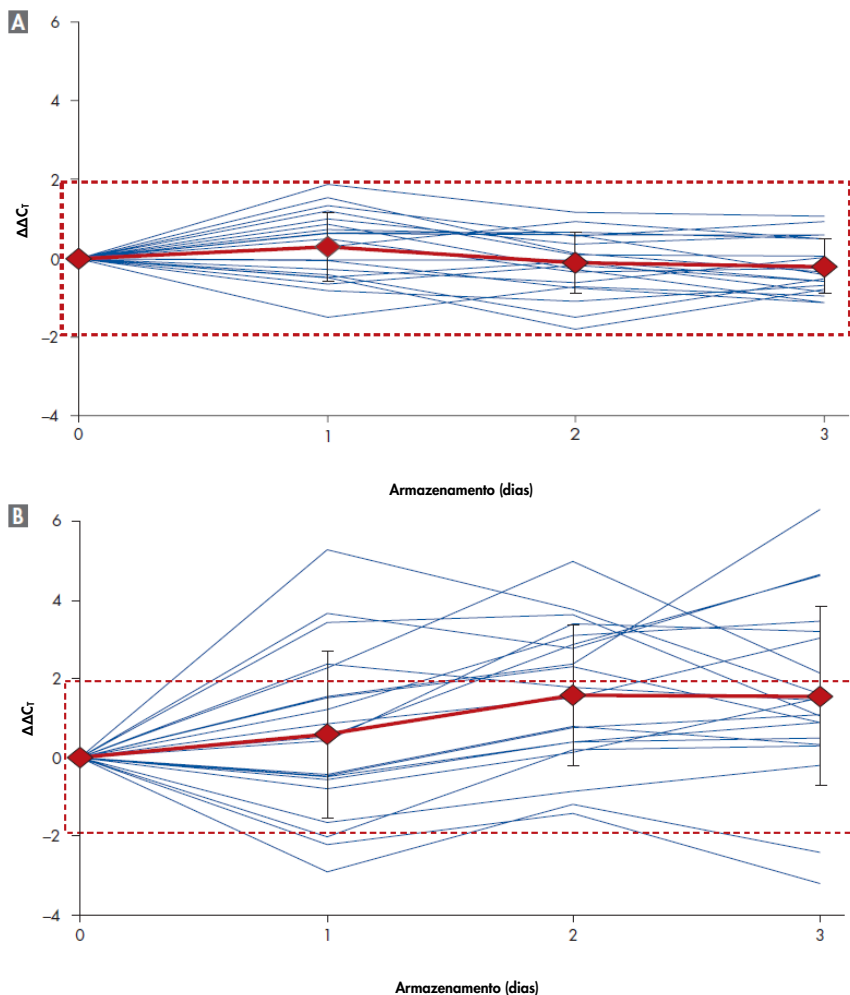


Figura 2. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 18–25 °C: IL1B. Procedeu-se à colheita de sangue e purificação do ARN total, após armazenamento a 18–25 °C, conforme descrito na Figura 1. Os níveis de transcrição relativos ao IL1B foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total ± 3 x do ensaio (1,93 C_T).

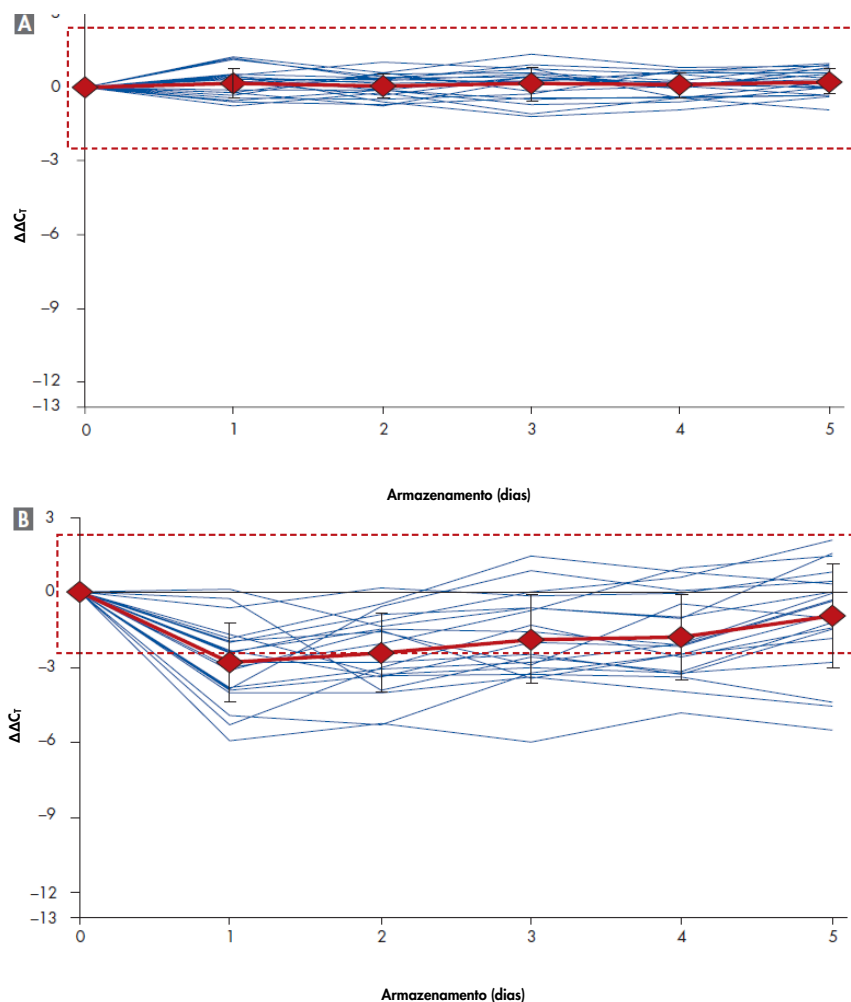


Figura 3. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 2–8 °C: FOS. Foi colhido sangue a 10 doadores, com amostras duplicadas e armazenadas a 2–8 °C durante o número de dias indicado, seguido por purificação do ARN total. **[A]** Procedeu-se à colheita de sangue, que foi armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) e o ARN total foi purificado usando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi colhido e armazenado em tubos para colheita de sangue padrão com EDTA como anticoagulante e o ARN total foi purificado com um método de extração padrão com solvente orgânico que inclui a limpeza do ARN baseada em membrana de gel de silício. Os níveis de transcrição relativos ao FOS foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total $\pm 3\times$ do ensaio (2,34 C_t).

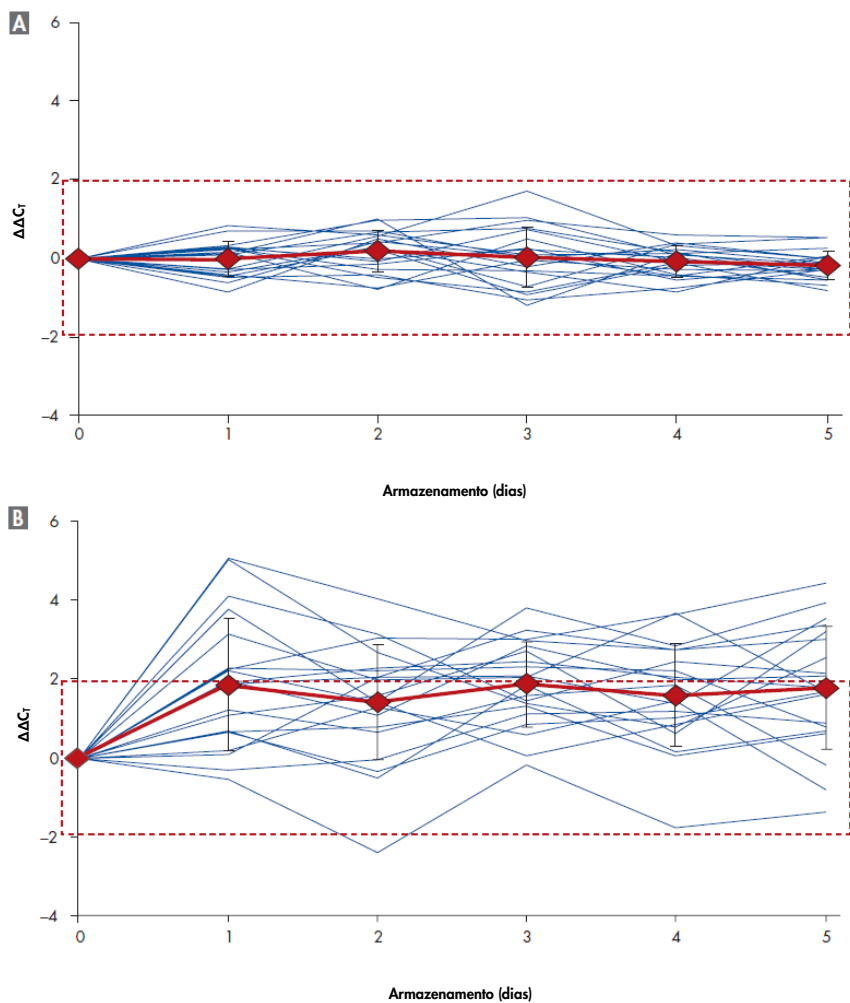


Figura 4. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 2–8 °C: IL1B. Procedeu-se à colheita de sangue e purificação do ARN total, após armazenamento a 2–8 °C, conforme descrito na Figura 3. Os níveis de transcrição relativos ao IL1B foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total $\pm 3x$ do ensaio (1,93 C_t).

Concentração e purificação do ARN

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação do ARN total de 2,5 ml de sangue total humano colhido num PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O procedimento é simples e pode ser efetuado utilizando um procedimento manual ou automatizado (consulte as Figuras 5 e 10, páginas 21 e 31). Nos dois protocolos, a purificação inicia-se com um passo de centrifugação para formar um pellet de ácidos nucleicos no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O pellet é lavado e ressuspensão, seguido por purificação manual ou automatizada do ARN. Em princípio, os dois protocolos seguem os mesmos passos do protocolo com os mesmos componentes do kit.

Purificação manual de ARN

Em pormenor, o pellet ressuspensão é incubado em tampões otimizados, juntamente com proteinase K (PK), para provocar a digestão de proteínas. É efetuada uma centrifugação adicional através da coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC) para homogeneizar o lisado de células e remover detritos celulares residuais. O sobrenadante da fração residual é transferido para um tubo de microcentrifugação limpo. Adiciona-se etanol para otimizar as condições de ligação, e o lisado é aplicado numa coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Durante uma curta centrifugação, o ARN liga-se, de forma seletiva, à membrana de gel de silício PAXgene, à medida que os contaminantes a atravessam. Os contaminantes restantes são removidos em vários passos de lavagem eficiente. Entre o primeiro e segundo passo de lavagem, a membrana é tratada com DNase I (RNFD) para remover vestígios de ADN ligado. Depois dos passos de lavagem, o ARN é eluído em tampão de eluição (BR5) e desnaturado por calor.

O ARN total purificado usando o PAXgene Blood RNA System é altamente puro. Usando o protocolo manual, os valores de A_{260}/A_{280} estão entre 1,8 e 2,2 e está presente $\leq 1\%$ (p/p) de ADN genómico em $\geq 95\%$ de todas as amostras, conforme determinado por PCR quantitativa, em tempo real, de uma sequência do gene da beta-actina. Pelo menos 95% das amostras não apresentam qualquer inibição em RT-PCR, quando se utiliza até 30% do eluato.

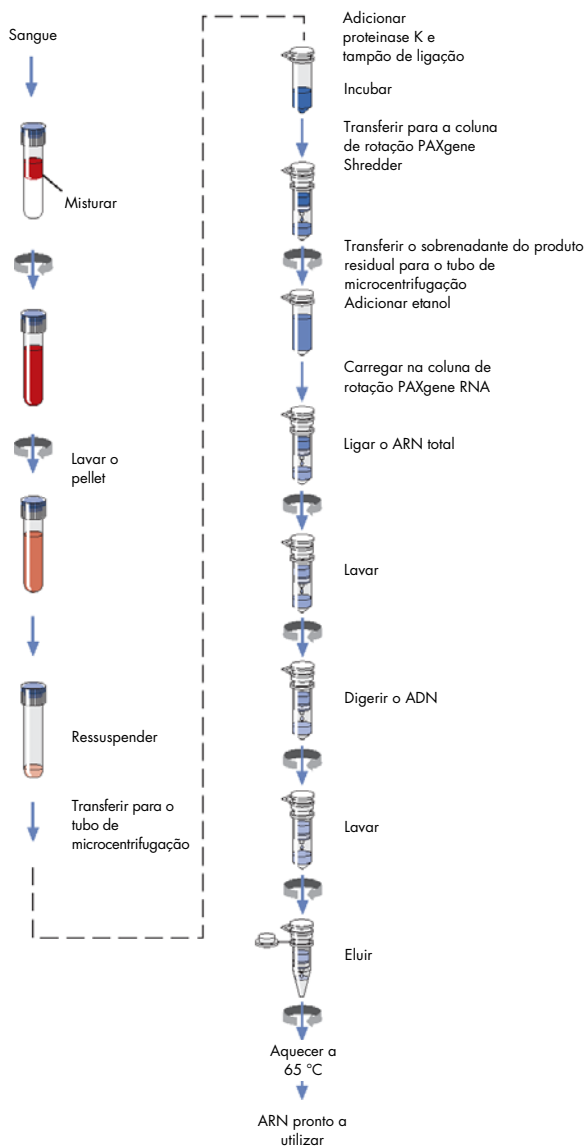


Figura 5. O procedimento manual do PAXgene Blood RNA.

Usando o protocolo manual, o tempo médio de preparação da amostra (com base em dados de 12 ensaios de preparação de amostras) é de, aproximadamente, 90 minutos*, com apenas 40 minutos de tempo de manipulação. Os rendimentos de ARN de 2,5 ml de sangue total humano saudável são $\geq 3 \mu\text{g}$ para $\geq 95\%$ das amostras processadas. Dado que os rendimentos são altamente dependentes do dador, os rendimentos individuais podem variar. Para dadores individuais, o sistema PAXgene Blood RNA oferece rendimentos altamente reprodutíveis e repetíveis (Figuras 6 e 7, páginas 23 e 24), assim como resultados da RT-PCR também reprodutíveis e repetíveis (Figuras 8 e 9, páginas 28 e 29), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

A Figura 6 (página 23) mostra a reprodutibilidade e repetibilidade do PAXgene Blood RNA System. Foram realizados estudos adicionais para mostrar a influência de diferentes lotes do PAXgene Blood RNA Kit e de diferentes técnicos na reprodutibilidade do rendimento do ARN e desempenho da RT-PCR em tempo real. Dado que para estes estudos foram utilizadas amostras do sangue de pools em vez de PAXgene Blood RNA Tubes individuais, os resultados não refletem a repetibilidade do sistema, incluindo a flutuação entre as colheitas de sangue individuais, mas apenas a repetibilidade da preparação das amostras (consulte a Figura 7, página 24).

* Tempo de teste do protocolo total, incluindo manipulação adiada dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem do pellet e ressuspensão do pellet).

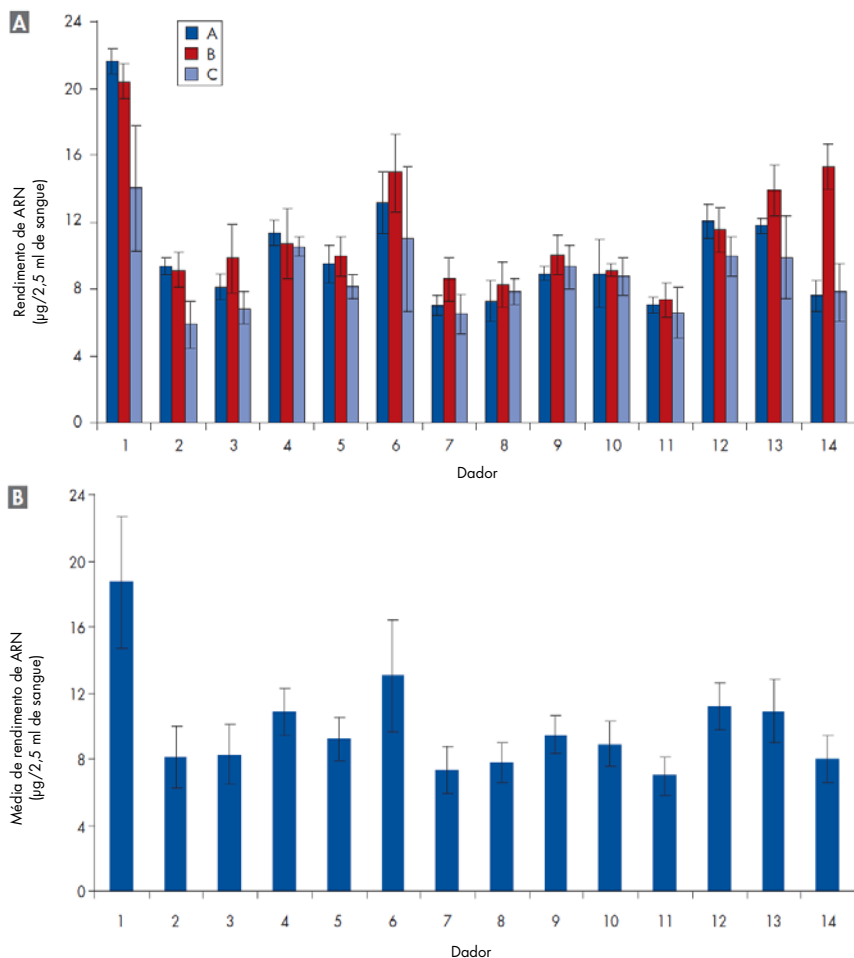


Figura 6. Purificação de ARN reprodutível e repetível. Amostras de sangue quadruplicadas de 14 dadores foram manualmente processadas por 3 técnicos de laboratórios diferentes [A, B, C]. Utilizaram-se três conjuntos de equipamento e todas as amostras preparadas por um único técnico foram processadas usando o mesmo equipamento. [A] Mostram-se os desvios médios e padrão do rendimento de ARN por amostras replicadas dos mesmos dadores e de técnicos diferentes. [B] Doze amostras de sangue replicadas de cada um dos 14 dadores foram processadas pelos 3 técnicos diferentes. São apresentados os desvios médios e padrão do rendimento de ARN por amostras dos mesmos dadores e de todos os técnicos. Para todas as amostras de ARN, as relações de A_{260}/A_{280} variaram entre 1,8 e 2,2.

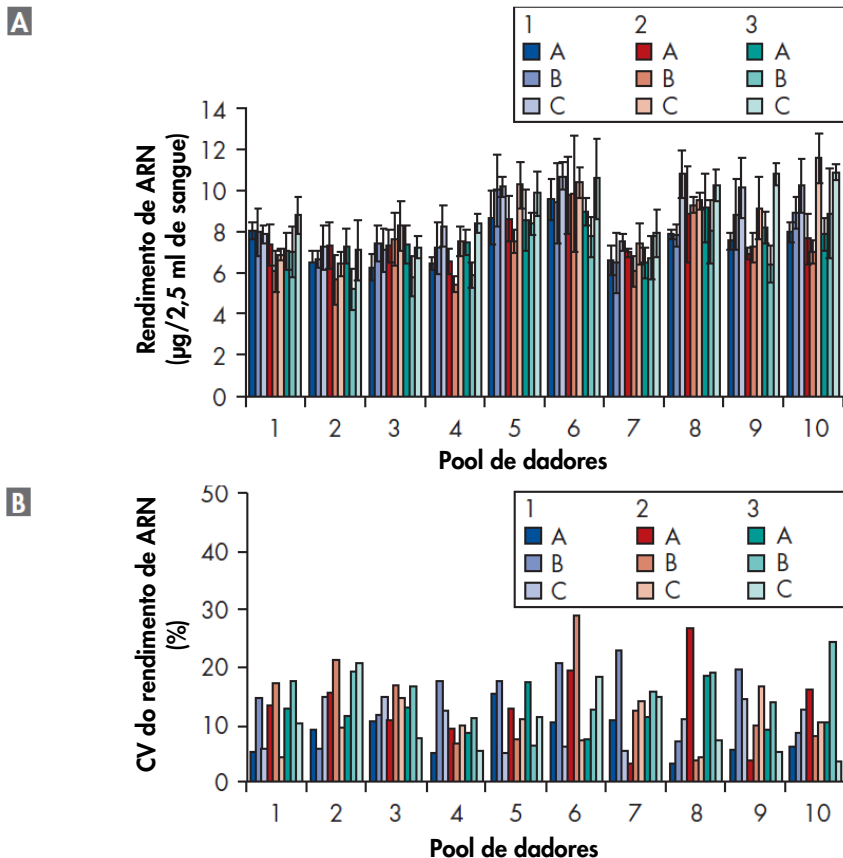


Figura 7. Repetibilidade e reprodutibilidade do rendimento de ARN por técnicos diferentes e diferentes lotes do PAXgene Blood RNA Kit utilizando amostras de sangue de pools. Foram colhidas amostras de sangue de 30 doadores diferentes em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 tubos por doador, 360 tubos no total). O conteúdo dos tubos de 3 doadores foi agrupado em pool e, subsequentemente, novamente dividido em 36 alíquotas de amostras. Estas 36 amostras por pool de 3 doadores foram processadas manualmente por 3 técnicos diferentes. Cada técnico utilizou 3 lotes diferentes do PAXgene Blood RNA Kit para a extração e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 10 pools de doadores. **[A]** Rendimento de ARN e desvio padrão para combinação técnico-lote. Amostras de sangue quadruplicadas de 10 pools de doadores foram processadas por 3 técnicos diferentes (A, B, C) com cada um dos 3 lotes do kit (1, 2, 3). São apresentados os rendimentos médios (colunas) e desvios padrão (barras de erro) por amostra quadruplicada do mesmo pool de doadores pelos diferentes técnicos e lotes de kit. **[B]** Coeficiente de variação (CV) de rendimento de ARN por pool de doadores para todas as combinações técnico-lote (A, B, C; 1, 2, 3) conforme calculado a partir do rendimento médio e desvio padrão do rendimento mostrados na Figura 7A.

Tabela 1A. Reprodutibilidade em cada lote e utilizador para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Pool de dadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, utilizador A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lote 1, utilizador B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lote 1, utilizador C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lote 2, utilizador A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lote 2, utilizador B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lote 2, utilizador C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lote 3, utilizador A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lote 3, utilizador B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lote 3, utilizador C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Combinação de dados	Pool de dadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, utilizador A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lote 1, utilizador B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lote 1, utilizador C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lote 2, utilizador A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lote 2, utilizador B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lote 2, utilizador C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lote 3, utilizador A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lote 3, utilizador B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lote 3, utilizador C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

Tabela 1B. Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Pool de dadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Utilizador A, todos os lotes	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Utilizador B, todos os lotes	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Utilizador C, todos os lotes	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
Combinação de dados	Pool de dadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Utilizador A, todos os lotes	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Utilizador B, todos os lotes	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Utilizador C, todos os lotes	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

Tabela 1C. Reprodutibilidade em cada lote e entre todos os utilizadores para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Pool de dadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lote 2, todos os utilizadores	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lote 3, todos os utilizadores	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
Combinação de dados	Pool de dadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lote 2, todos os utilizadores	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lote 3, todos os utilizadores	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

Tabela 1D. Reprodutibilidade entre todos os lotes e todos os utilizadores para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)

Combinação de dados	Pool de dadores 1 5,1 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 6 6,5 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17

Combinação de dados	Pool de dadores 9 8,4 x 10 ⁶ células/ml			Pool de dadores 10 10,2 x 10 ⁶ células/ml		
	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)	Rendimento médio (µg)	DP (µg)	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Análise detalhada de 4 pools de dadores representativos. Os pools foram seleccionados de acordo com a contagem de glóbulos brancos e refletem os valores superior, médio e inferior do intervalo normal das contagens de glóbulos brancos (4,8 x 10⁶ – 1,1 x 10⁷ leucócitos/ml). A contagem de glóbulos brancos representa o valor médio de 3 contagens de glóbulos brancos dos 3 dadores por pool de dadores.

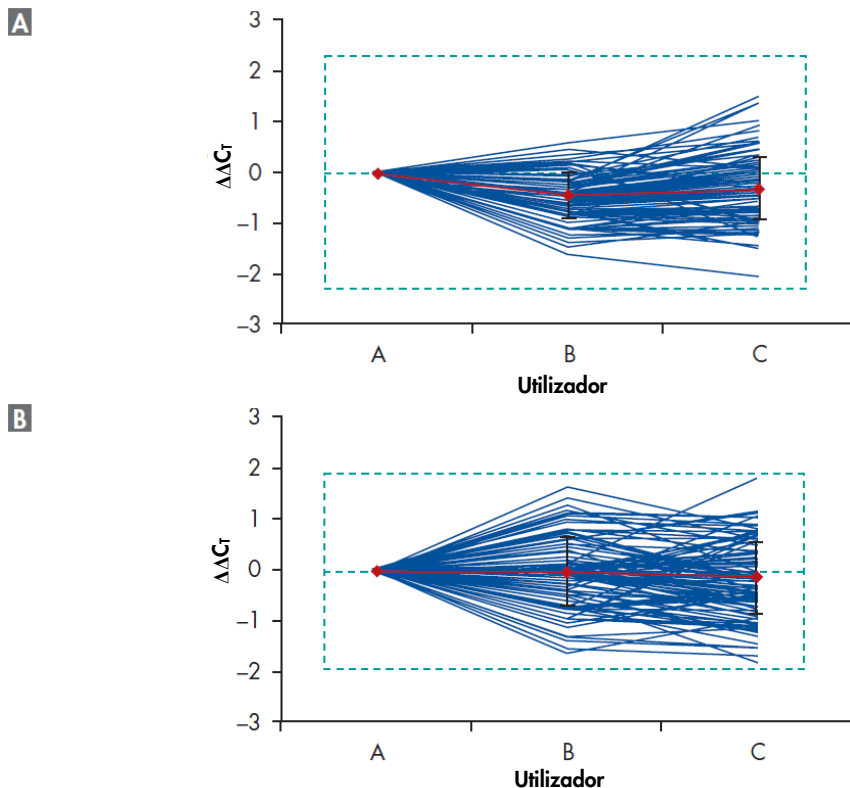


Figura 8. Reprodutibilidade da RT-PCR — entre utilizadores. Foi utilizada a purificação de ARN na experiência descrita na Figura 7 para a RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcrição relativos do **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. São traçados os valores de todas as amostras, relativos aos valores para o utilizador 1 (10 pools de dadores x 3 lotes de kit x 4 replicações = 120 conjuntos de dados para cada gene) com desvios médios (linhas vermelhas) e desvios padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total $\pm 3\times$ dos ensaios (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

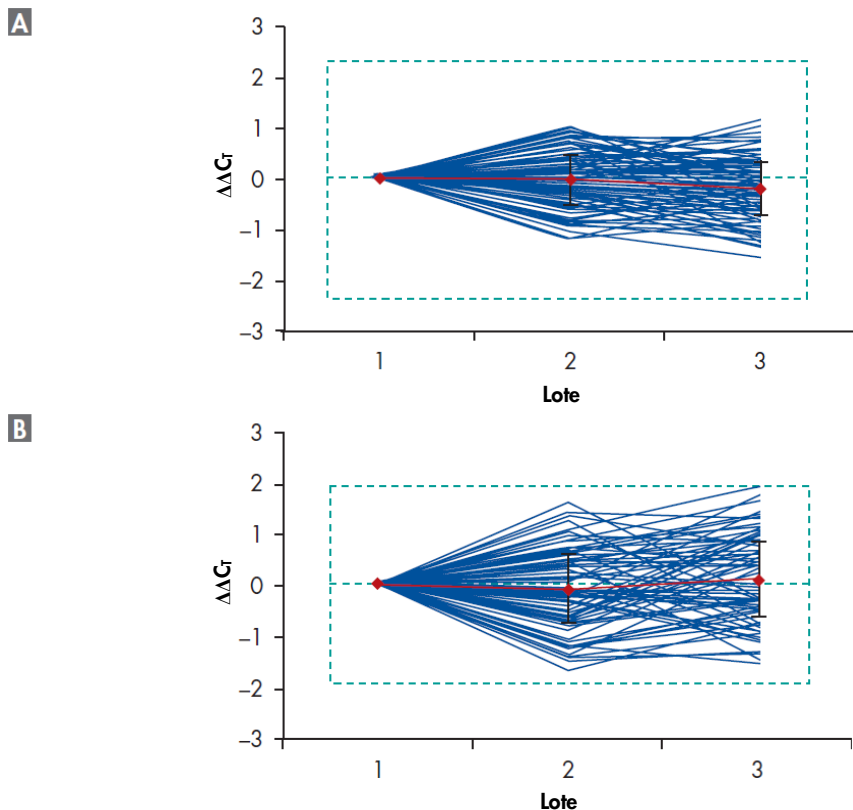


Figura 9. Reprodutibilidade de RT-PCR — entre lotes de kit. Foi utilizada a purificação de ARN na experiência descrita na Figura 7 para a RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcrição relativos do **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. São traçados os valores de todas as amostras, relativos aos valores para o lote 1 do kit (10 pools de doadores \times 3 utilizadores \times 4 replicações = 120 conjuntos de dados para cada gene) com desvios médios (linhas vermelhas) e desvios padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total $\pm 3\times$ dos ensaios (FOS: 2,34 C_t ; IL1B: 1,93 C_t).

Tabela 2. Resumo dos dados da RT-PCR das Figuras 8 e 9

Sistema de teste	Ensaio FOS/18S ARNr		Ensaio IL1B/18S ARNr	
Comparação de dados	Média ($\Delta\Delta C_T$)	\pm DP ($\Delta\Delta C_T$)	Média ($\Delta\Delta C_T$)	\pm DP ($\Delta\Delta C_T$)
Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes				
Todos os utilizadores, lote 1–lote 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os utilizadores, lote 1–lote 2	–0,03	0,48	–0,07	0,66
Todos os utilizadores, lote 1–lote 3	–0,21	0,52	0,11	0,71
Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes				
Todos os lotes, utilizador A–utilizador A	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os lotes, utilizador A–utilizador B	–0,46	0,44	–0,06	0,69
Todos os lotes, utilizador A–utilizador C	–0,31	0,60	–0,15	0,71

Utilizador: técnico, efetuou o estudo.
Lote: número do lote do kit utilizado neste estudo.
DP: desvio padrão.
Mostram-se os valores $\Delta\Delta C_T$ médios (N=120) e os desvios padrão para os dados apresentados nas Figuras 8 e 9.

Purificação automatizada de ARN

A preparação de amostras é automatizada utilizando o instrumento QIAcube® padrão (ref.º 9001882 [110 V], ref.º 9001293 [230 V]; sem incluir o QIAcube Connect) e segue os mesmos passos do procedimento manual, permitindo-lhe continuar a utilizar o PAXgene Blood RNA Kit para a purificação de ARN de elevada qualidade. Consulte o Manual do utilizador do QIAcube (*QIAcube User Manual*) e www.qiagen.com/MyQIAcube para mais informações sobre o QIAcube.

O protocolo de purificação automatizada de ARN é constituído por 2 partes (ou protocolos), "PAXgene Blood RNA Part A" e "PAXgene Blood RNA Part B", com uma curta intervenção manual entre as 2 partes (consulte a Figura 10, página 31).

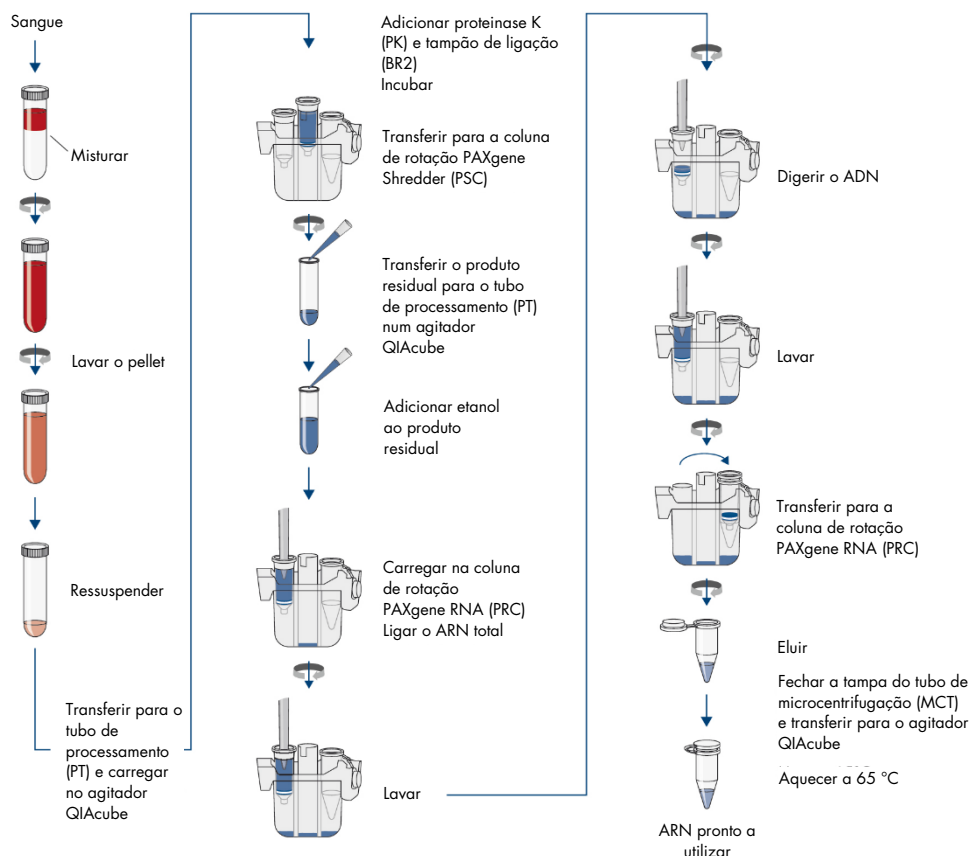


Figura 10. O procedimento automatizado do PAXgene Blood RNA.

O pellet de ácidos nucleicos centrifugado, lavado e ressusensão (consulte "Concentração e purificação do ARN", página 20) é transferido do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para tubos de processamento (PT), que são colocados na unidade termoagitadora na mesa de trabalho do QIAcube. O técnico seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" a partir do menu. O QIAcube efetua os passos do protocolo até à eluição do ARN em tampão de eluição (BR5). O técnico transfere os tubos de microcentrifugação (MCT), que

contêm o ARN purificado, para a unidade termoagitadora do QIAcube. O técnico seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA Part B" a partir do menu e a desnaturação por calor é efetuada pelo QIAcube.

O tempo médio de preparação da amostra (com base em dados de 12 ensaios de preparação de amostras) é de 151 minutos*, com significativamente menos tempo de manipulação em comparação com o protocolo manual.

Os rendimentos de ARN de 2,5 ml de sangue total humano saudável são $\geq 3 \mu\text{g}$ para $\geq 95\%$ das amostras processadas. Na Figura 11 (página 33) indicam-se os rendimentos de ARN de um total de 216 amostras preparadas usando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 técnicos. Dado que para estes estudos se utilizaram amostras de sangue em pools em vez de PAXgene Blood RNA Tubes individuais, os resultados não refletem o rendimento de ARN esperado com amostras individuais de colheitas de sangue individuais. Dado que os rendimentos são altamente dependentes do dador, os rendimentos individuais podem variar (Figura 11, página 33).

Pelo menos 95% das amostras não apresentam qualquer inibição em RT-PCR, quando se utiliza até 30% do eluato. Utilizando o protocolo automatizado, a contaminação cruzada entre amostras é indetetável, conforme determinado por RT-PCR quantitativa em tempo real de sequências de ABL1 e transcrições de FOS em amostras negativas para ARN (água) emparelhadas com amostras positivas para ARN (sangue total humano) no mesmo ensaio.

O ARN purificado com o PAXgene Blood RNA System e o protocolo automatizado apresentam pureza, conforme demonstrado por ausência de inibição na RT-PCR (consulte a Figura 11, página 33) e pelos valores de A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,2. O ADN genómico está presente a $\leq 1\%$ (p/p) em $\geq 95\%$ de todas as amostras, conforme determinado por PCR quantitativa, em tempo real, de uma sequência do gene da beta-actina. Nas Figuras 12 e 13 (páginas 33 e 34) mostram-se os valores de A_{260}/A_{280} e o ADN genómico relativo de um total de 216 amostras preparadas usando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 técnicos.

* Tempo de teste do protocolo total, incluindo manipulação adiandada dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem do pellet e ressuspensão do pellet).

Rendimento de ARN ($\mu\text{g}/2,5 \text{ ml}$ de sangue)

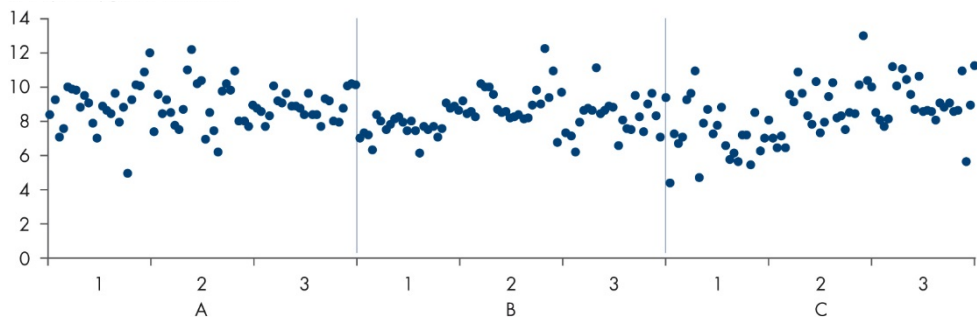


Figura 11. Rendimento de ARN — processamento automatizado. Foram colhidas amostras de sangue de 36 doadores diferentes em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 6 tubos por doador, 216 tubos no total). O conteúdo dos tubos de 6 doadores foi agrupado em pool e, subsequentemente, novamente dividido em 36 alíquotas de amostras. Estas 36 amostras por pool de 6 doadores foram processadas por 3 técnicos diferentes (A, B, C). Cada técnico utilizou 3 lotes diferentes do PAXgene Blood RNA Kit (1, 2, 3) para a extração automatizada e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 6 pools de doadores. Mostram-se os rendimentos de ARN de todas as amostras individuais para cada combinação técnico-lote.

Pureza de ARN (A_{260}/A_{280})

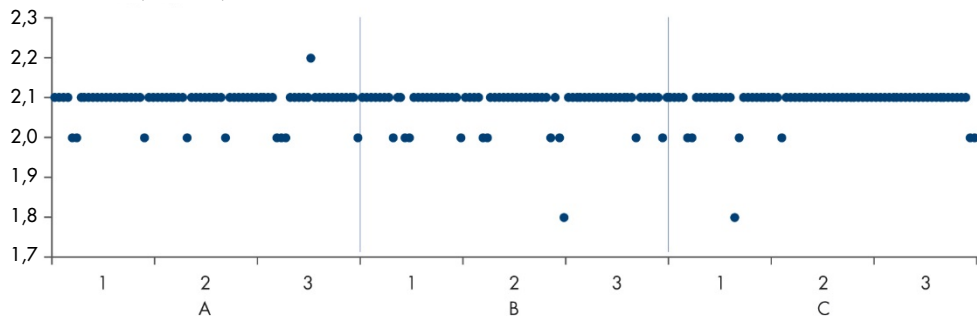


Figura 12. Pureza de ARN (valores de A_{260}/A_{280}) — processamento automatizado. O ARN foi purificado por 3 técnicos diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit na experiência descrita na Figura 11. Mostram-se os valores de A_{260}/A_{280} de todas as amostras individuais para cada combinação técnico-lote.

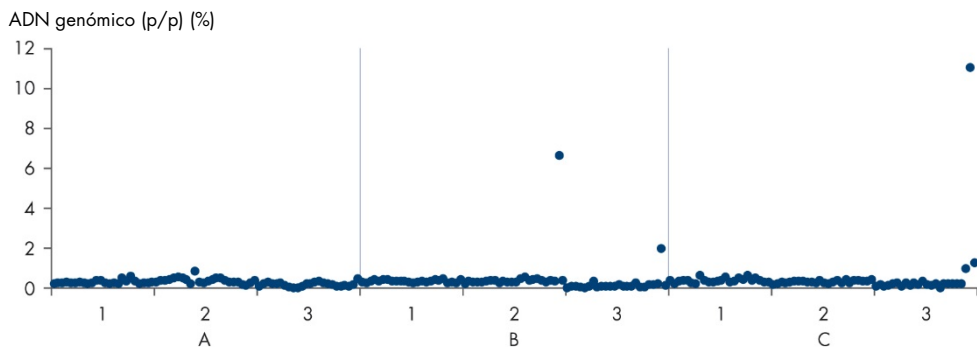


Figura 13. Pureza de ARN (% de contaminação de ADN genómico) — processamento automatizado. O ARN foi purificado por 3 técnicos diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit na experiência descrita na Figura 11. Mostram-se os valores de ADN genómico (p/p) em todas as amostras individuais para cada combinação técnico-lote.

O protocolo automatizado de purificação de ARN usando o PAXgene Blood RNA System produz resultados de RT-PCR altamente reprodutíveis e repetíveis, conforme demonstrado na Figura 14, (página 35), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

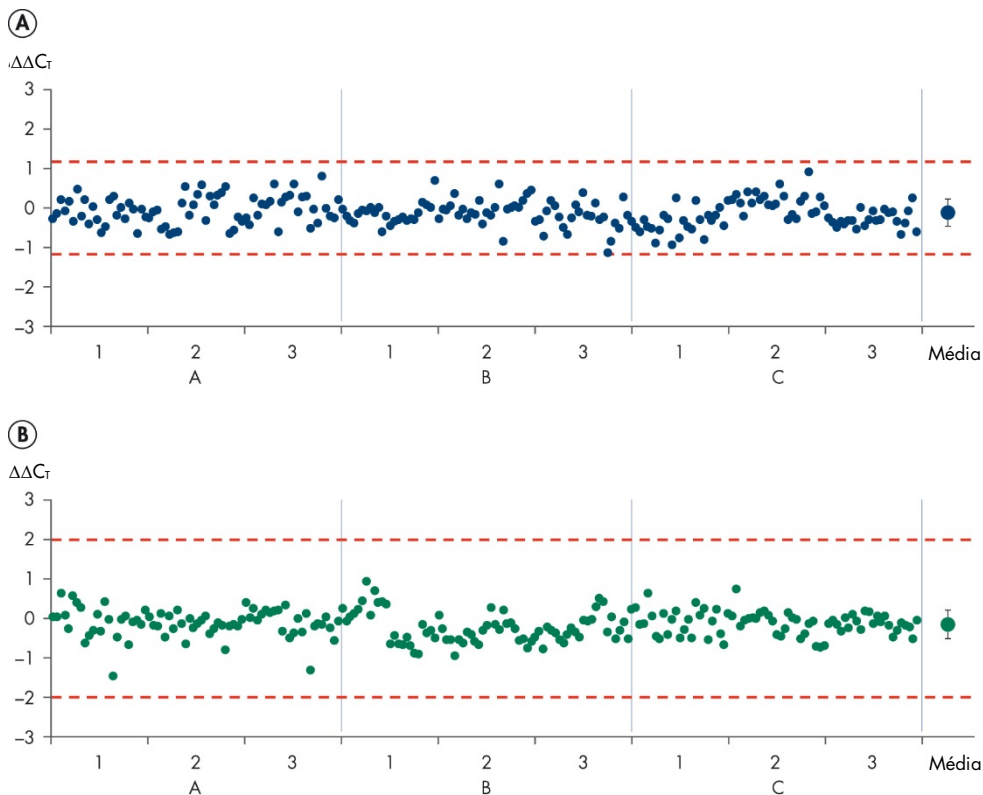


Figura 14. Reprodutibilidade de RT-PCR — entre os protocolos automatizado e manual. O ARN foi purificado por 3 técnicos diferentes (A, B, C) usando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit utilizando o protocolo automatizado na experiência descrita na Figura 11. Em paralelo, o ARN foi purificado a partir dos tubos de replicações correspondentes utilizando o protocolo manual. Os níveis de transcrição relativos do **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. As possíveis diferenças dos níveis de transcrição entre o ARN preparado a partir das amostras de sangue emparelhadas utilizando os dois protocolos de extração (protocolo automatizado e manual) foram calculadas pelo método $\Delta\Delta C_t$. Os valores individuais $\Delta\Delta C_t$ de todos os pares de amostras (4 replicações x 6 pools de doadores x 3 lotes de kits x 3 técnicos = 216 pares para cada gene) são traçados como pontos únicos com valores médios (pontos maiores) e desvios padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total $\pm 3x$ dos ensaios (FOS: 1,16 C_t ; IL1B: 1,98 C_t ; diferentes precisões de ensaio conforme comparado com as Figuras 1–4, 8 e 9 devido a diferentes versões de ensaio).

Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador

Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

Para todos os protocolos

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; ref.º 762165)
- Etanol (96–100%, grau de pureza p.a.)
- Pipetas* (10 µl–4 ml)
- Pontas de pipeta isentas de RNase, estéreis e com barreira para aerossóis†
- Proveta graduada‡
- Centrífuga* capaz de atingir 3000–5000 x g, e equipada com um rotor de balanço exterior e suportes para PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitador de vórtex*
- Gelo picado
- Caneta permanente para rotular

Para o protocolo manual

- Microcentrífuga de velocidade variável* capaz de atingir um intervalo de pelo menos 1000–8000 x g, apesar de forças g inferiores e superiores serem aplicáveis (consulte os

* Assegure-se de que os instrumentos foram objeto de verificação, manutenção e calibração regulares, de acordo com as instruções do fabricante.

† Assegure-se de que está familiarizado com as normas sobre a manipulação do ARN (Apêndice A, página 64).

‡ Para a adição de etanol ao concentrado de tampão BR4.

passos do protocolo para obter detalhes) e equipadas com um rotor para tubos de microcentrifugação de 2 ml

- Incubador-agitador* capaz de incubar a 55 °C e 65 °C e agitar a ≥ 400 rpm, não ultrapassando 1400 rpm (por exemplo, Eppendorf® Thermomixer Compact ou equivalente)

Para o protocolo automatizado

- QIAcube* (QIAGEN, ref.º 9001882 [110 V], ref.º 9001293 [230 V])
- Tesouras

Consumíveis QIAcube

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, ref.º 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, ref.º 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, ref.º 990394)†

Acessórios QIAcube

- Reagent Bottle Rack (QIAGEN, ref.º 990390)§
- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, ref.º 990392)†

* Assegure-se de que os instrumentos foram objeto de verificação, manutenção e calibração regulares, de acordo com as instruções do fabricante.

† Também incluído no Starter Pack (Pacote de iniciação), QIAcube (QIAGEN, ref.º 990395)

Notas importantes

Utilizar o QIAcube

Assegure-se de que está familiarizado com o funcionamento do QIAcube. Leia o *Manual do utilizador do QIAcube* e todas as informações adicionais fornecidas com o QIAcube, prestando especial atenção às informações de segurança, antes de dar início aos protocolos automatizados do PAXgene Blood RNA.

Iniciar o QIAcube

Feche a porta do QIAcube e ligue o QIAcube no interruptor de alimentação (consulte a Figura 15, página 39).

Ouve-se um sinal sonoro e aparece o ecrã de arranque. O instrumento efetua automaticamente testes de inicialização.

Instalar protocolos no QIAcube

É necessária uma instalação de protocolos inicial antes que se possa efetuar a primeira preparação de ARN no QIAcube. Instale os protocolos "PAXgene Blood RNA Part A" e "PAXgene Blood RNA Part B".

Os protocolos são fornecidos em www.qiagen.com/MyQIAcube e é necessário descarregá-los para a pen USB fornecida com o QIAcube e transferi-los para o QIAcube através da porta USB.

A porta USB, situada atrás do painel protetor (consulte a Figura 15, página 39), permite a ligação do QIAcube a uma pen USB (fornecida com o QIAcube). Os ficheiros de dados, tais como ficheiros de registo ou ficheiros de relatório, também podem ser transferidos pela porta USB do QIAcube para a pen USB.



A porta USB destina-se apenas a ser utilizada com a pen USB fornecida pela QIAGEN. Não ligue outros dispositivos a esta porta.



Não retire a pen USB enquanto estiverem a ser descarregados protocolos ou transferidos ficheiros de dados, nem durante um ensaio de protocolo.



Figura 15. Vista dianteira do QIAcube.

1

Ecrã tátil

2

Porta

3

Porta série RS232 atrás do painel protetor (para utilização exclusiva por especialistas em assistência técnica do instrumento QIAGEN)

4

Porta USB atrás do painel protetor

5

Interruptor de alimentação

6

Gaveta de resíduos

Carregar o QIAcube

Para poupar tempo, o carregamento pode ser efetuado durante um ou ambos os passos de centrifugação de 10 minutos (passos 3 e 5) em "Protocolo: Purificação automatizada do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", página 56.

Frascos de reagente

Antes de cada ensaio no QIAcube, certifique-se de que os 4 frascos de reagente com os reagentes listados na Tabela 3 estão cheios até ao nível máximo do indicador ou, se isso não for possível, até ao nível permitido pelos volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule claramente os frascos e as tampas com os nomes do tampão e coloque-os nas posições adequadas no suporte de frascos de reagente. Carregue o suporte na mesa de trabalho do QIAcube conforme demonstrado (Figuras 16 e 17, páginas 41 e 42).



O volume de tampão BR2 fornecido não irá encher o frasco de reagente até ao nível do indicador. Os tampões BR3 e BR4 não irão encher o frasco até ao nível do indicador após o processamento de várias amostras nos ensaios anteriores.



Certifique-se de que retira as tampas dos frascos antes de os colocar na mesa de trabalho.



Os volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit (50) são suficientes para um máximo de 7 ensaios de preparação de ARN no QIAcube e cada ensaio pode ter entre 2 a 12 amostras. Em geral, os ensaios com números de amostra inferiores devem ser evitados para processar um total de 50 amostras por kit com um máximo de 7 ensaios de preparação de ARN. Mais de 7 ensaios de preparação de ARN podem originar volumes de tampão insuficientes para o processamento das últimas amostras.

Tabela 3. Posições no suporte de frascos de reagente

Posição	Reagente
1	Tampão de ligação (BR2)
2	Etanol a 96–100%
3	Tampão de lavagem 1 (BR3)
4	Tampão de lavagem 2 (BR4) *
5	– (deixar vazio)
6	– (deixar vazio)

* O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

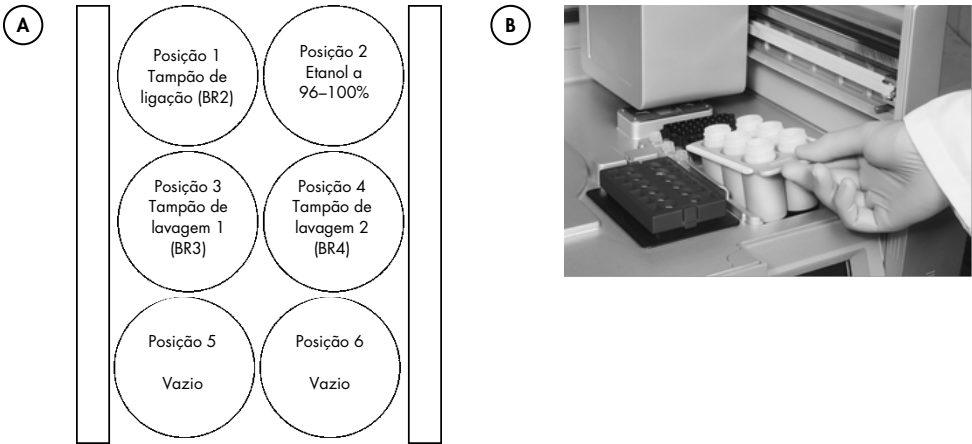


Figura 16. Carregar o suporte de frascos de reagente. [A] Posições esquemáticas e conteúdo dos frascos no suporte de frascos de reagente. [B] Carregar o suporte no QIAcube.

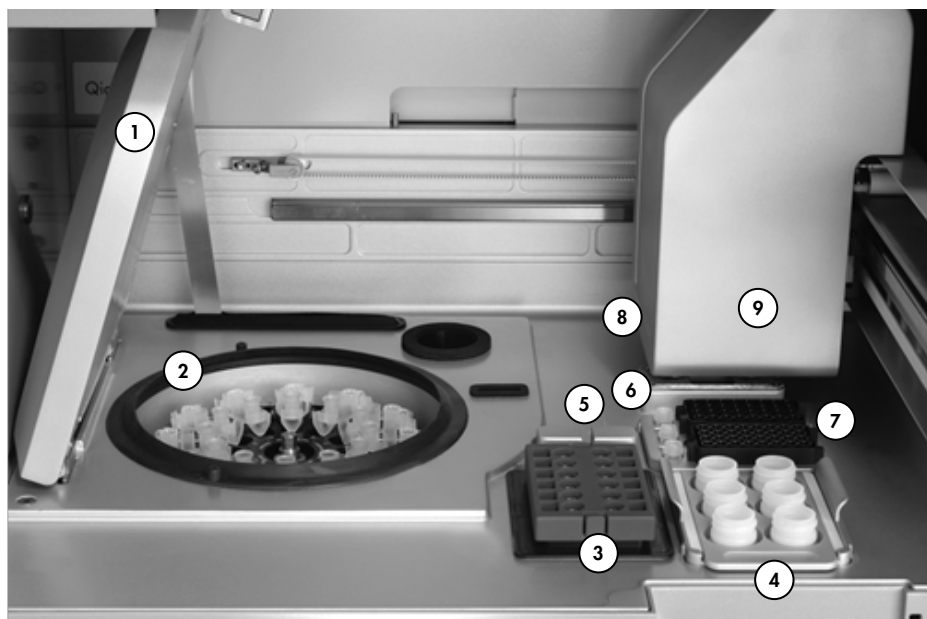


Figura 17. Vista interna do QIAcube.

- | | |
|---------------------------------|--|
| ① Tampa da centrífuga | ⑥ Ranhuras para tubos de microcentrifugação |
| ② Centrífuga | ⑦ Suportes de pontas |
| ③ Agitador | ⑧ Ranhuras de eliminação para pontas e colunas |
| ④ Suporte do frasco de reagente | ⑨ Braço robótico |
| ⑤ Sensor de pontas | |

Colunas de rotação (PRC, PSC), tubos de microcentrifugação (MCT) e material de plástico do QIAcube

Coloque 2 suportes de pontas cheios com pontas com filtro de 1000 µl no QIAcube (consulte a Figura 17, página 42). Volte a encher os suportes com pontas quando for necessário.



Use apenas pontas com filtro de 1000 µl concebidas para utilização com o QIAcube.

Rotule os adaptadores do rotor e tubos de microcentrifugação (MCT) para cada amostra utilizando uma caneta permanente. Abra as colunas de rotação PAXgene Shredder (PSC) a usar e corte totalmente as tampas utilizando uma tesoura (consulte a Figura 18, página 44).



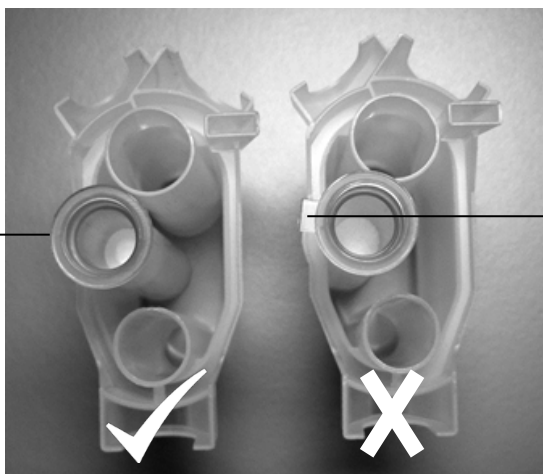
Para um funcionamento adequado da garra robótica do QIAcube, retire completamente (corte) as tampas e todas as peças de plástico que ligam a tampa às colunas de rotação PAXgene Shredder (PSC; consulte a Figura 16). Caso contrário, a garra robótica não poderá agarrar as colunas de rotação (PSC, PRC) corretamente.

Carregue a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC), coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC, sem tampa) e tubo de microcentrifugação rotulado (MCT) nas posições adequadas em cada adaptador do rotor rotulado, conforme demonstrado na Tabela 4 e Figura 19 (página 44).



Certifique-se de que as tampas da coluna de rotação (PRC) e tubos de microcentrifugação (MCT) são totalmente empurradas para baixo até à base das ranhuras na extremidade do adaptador do rotor, caso contrário as tampas irão partir-se durante a centrifugação.

Tampa da
coluna
removida
de forma
correta



Tampa da
coluna
removida de
forma
incorreta;
parte da
tampa ainda
presa

Figura 18. Carregar uma coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC). A coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC) é carregada na posição central do adaptador do rotor. Corte a tampa antes de carregar a coluna (PSC).

Tabela 4. Material de laboratório no adaptador do rotor

Posição	Reagente	Posição da tampa
1	Coluna de rotação PAXgene RNA (vermelha, PRC)	L1
2	Coluna de rotação PAXgene Shredder (lilás, PSC) (corte a tampa antes de colocar no adaptador do rotor)	–
3	Tubo de microcentrifugação (MCT)*	L3

* Use os tubos de microcentrifugação (1,5 ml) incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

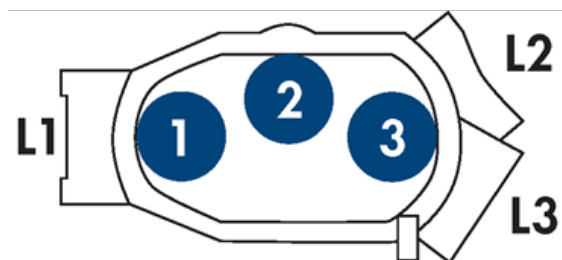


Figura 19. Posições no adaptador do rotor. O adaptador do rotor apresenta três posições de tubo (1–3) e três posições de tampa (L1–L3).

Carregar a centrífuga

Carregue os adaptadores do rotor montados nos baldes da centrífuga conforme demonstrado na Figura 20 abaixo.



Se forem processadas menos de 12 amostras, certifique-se de carregar o rotor da centrífuga equilibrado radialmente (consulte a Figura 21, página 46). Todos os baldes da centrífuga devem ser montados antes de se iniciar um ensaio do protocolo, mesmo que se pretendam processar menos de 12 amostras. Não é possível processar uma única amostra ou 11 amostras.

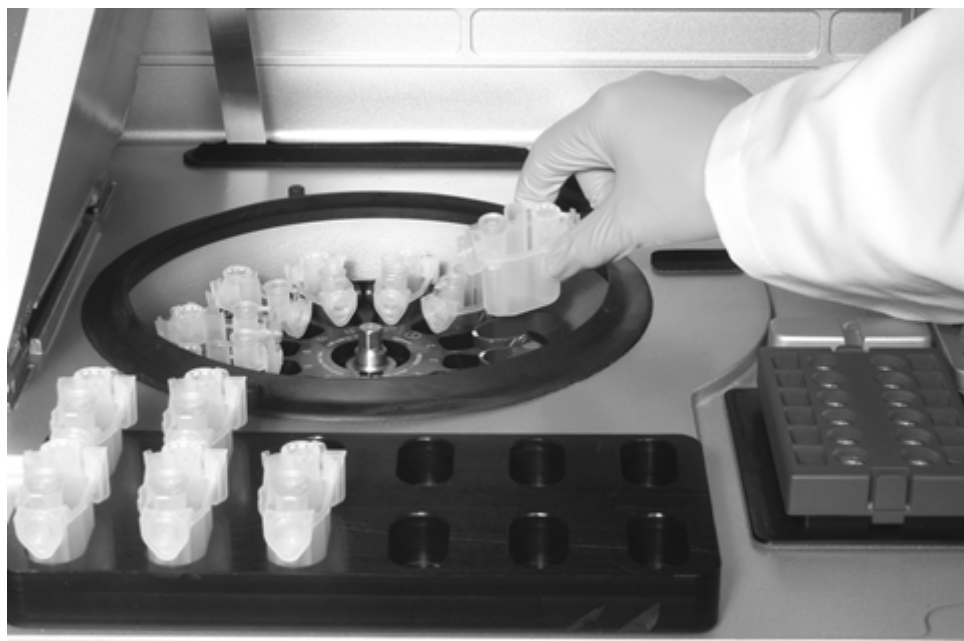


Figura 20. Carregar a centrífuga. Carregar os adaptadores do rotor montados nos baldes da centrífuga.

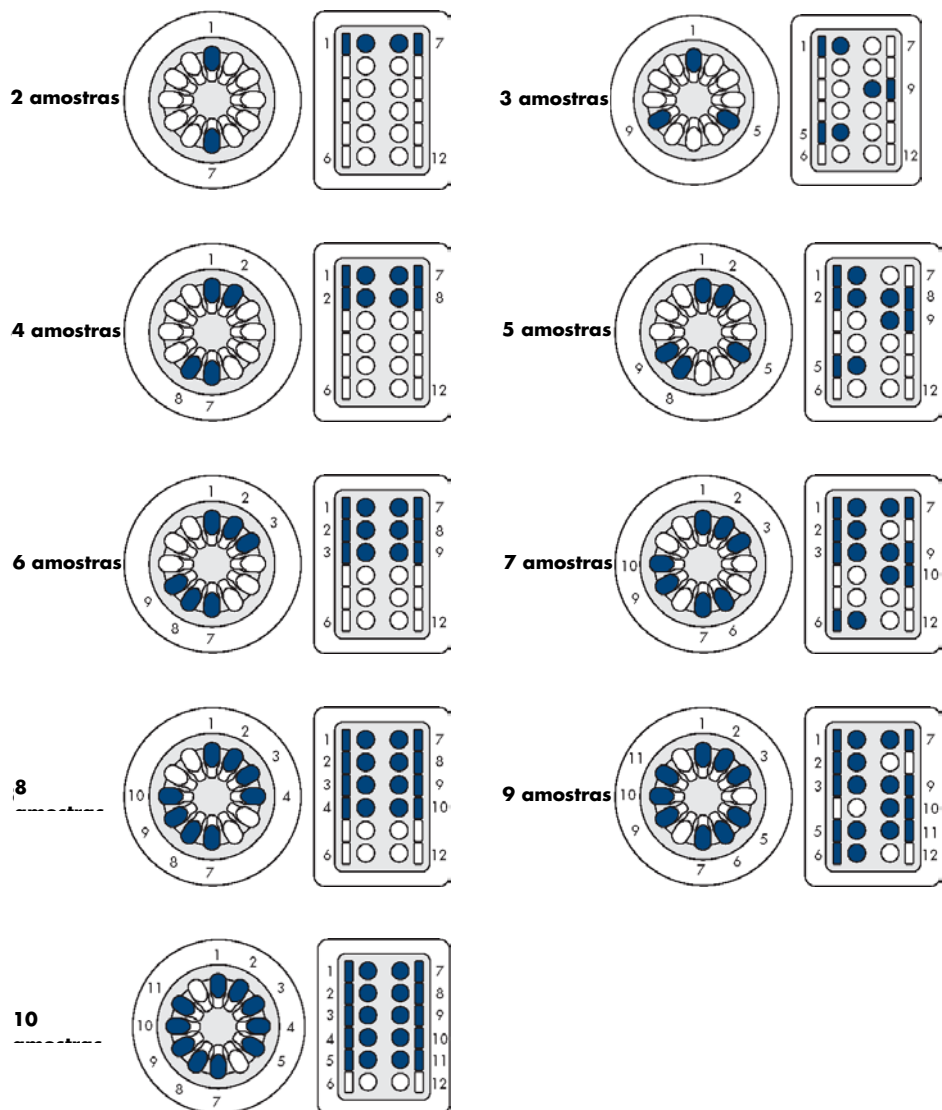


Figura 21. Carregar a centrífuga e o agitador. Mostram-se as posições da centrífuga e do agitador para processamento de duas (2) a dez (10) amostras. Não é possível processar uma amostra ou 11 amostras.

Tubos de processamento (PT)

Retire os tubos de processamento (PT) deixados nas ranhuras para tubos de microcentrifugação em ensaios anteriores (consulte a Figura 17, página 42). Encha 3 tubos de processamento (PT) com a quantidade de reagentes indicada na Tabela 5, de acordo com o número de amostras do ensaio.

Para a mistura de incubação de DNase I, pipete o volume de tampão de digestão de ADN indicado (RDD) num tubo de processamento (PT) e adicione o volume indicado de solução-mãe de DNase I (RNFD). Misture, pipetando suavemente a mistura completa para cima e para baixo 3 vezes, utilizando uma ponta de pipeta de 1000 µl.

Use os tubos de processamento (PT) de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule claramente os tubos (PT) com os nomes dos reagentes e coloque-os na posição adequada nas ranhuras para tubos de microcentrifugação, conforme indicado na Tabela 6 (página 48).



A DNase I (RNFD) é especialmente sensível à desnaturação física. Misture, pipetando apenas, e utilizando pontas de pipetas de diâmetro amplo para reduzir a deformação. Não agite no vórtex.



Certifique-se de que é pipetado apenas o volume necessário, conforme indicado na Tabela 5.

Tabela 5. Volume de reagentes necessário nos tubos de processamento para as ranhuras de tubos de microcentrifugação

Número de amostras	Volume de reagente para o número indicado de amostras (µl)		
	Proteinase K (PK)	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

Tabela 6. Ranhuras para tubos de microcentrifugação

	Posição		
	A	B	C
Conteúdo	Proteinase K (PK)	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (BR5)
Recipiente	Tubo de processamento (PT)*	Tubo de processamento (PT)*	Tubo de processamento (PT)*

* Use os tubos de processamento (PT) de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

Protocolo: Purificação manual do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Certifique-se de que a caixa do kit está intacta e não se apresenta danificada e que os tampões não apresentam fugas. Não utilize um kit que esteja danificado.
- Durante a utilização de uma pipeta, certifique-se de que está definida para o volume correto e que o líquido é cuidadosa e totalmente aspirado e dispensado.
- Para evitar transferir amostras para o tubo ou coluna de rotação errados, assegure-se de que todos os tubos e colunas de rotação são corretamente rotulados com uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de cada tubo (PT, MCT). Para as colunas de rotação, rotule o corpo do respectivo tubo de processamento (PT). Feche todos os tubos ou colunas de rotação depois de ter sido transferido líquido.
- Derrames acidentais de amostras e tampões durante o procedimento podem reduzir o rendimento e a pureza do ARN.
- Salvo indicação em contrário, todos os passos deste protocolo, incluindo os passos de centrifugação, devem ser efetuados à temperatura ambiente (15–25 °C).

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as seguintes precauções indicadas são necessárias quando se manipulam amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra para a coluna de rotação (PRC, PSC) sem humedecer os bordos da coluna.
- Troque sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Use pontas de pipeta com barreira para aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de rotação (PRC, PSC) com a ponta da pipeta.
- Depois de agitar um tubo de microcentrifugação (MCT) no vórtex ou depois de o aquecer, centrifugue-o durante breves instantes para eliminar gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contacto entre as luvas e a amostra, troque imediatamente de luvas.
- Feche a coluna de rotação (PRC, PSC) antes de a colocar na microcentrífuga. Centrifugue conforme descrito no procedimento.
- Abra apenas uma coluna de rotação (PRC, PSC) de cada vez e tenha cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Para um processamento eficiente de amostras múltiplas em paralelo, encha um suporte com tubos de processamento (PT) para os quais as colunas de rotação (PRC, PSC) possam ser transferidas depois da centrifugação. Elimine os tubos de processamento (PT) usados que contêm o produto residual e coloque os novos tubos de processamento (PT) que contêm as colunas de rotação (PRC, PSC) diretamente na microcentrífuga.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- O sangue deve ser colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*. Se for necessário, consulte o Apêndice C (página 67) para obter recomendações sobre a manipulação de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) são incubados durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente depois da colheita de sangue, para garantir a lise completa das células sanguíneas. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) de um dia para o outro pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, –20 °C ou –70 °C depois da colheita de sangue, equilibre-o primeiro até à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente durante 2 horas antes de iniciar o procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 10.
- Leia também as normas sobre a manipulação do ARN (Apêndice A, página 65).

- Assegure-se de que os instrumentos, como pipetas e incubador-agitador, são verificados e calibrados regularmente, de acordo com as recomendações do fabricante.
- Para os passos 5 e 20, é necessário um incubador-agitador. Ajuste a temperatura do incubador-agitador para 55 °C.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se for necessário, aqueça a 37 °C para dissolvê-lo.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver a utilizar o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare uma solução-mãe de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades de Kunitz) * em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tenha cuidado para não perder DNase I (RNFD) ao abrir o frasco. Não agite a DNase I reconstituída (RNFD) no vórtex. A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser efetuada apenas invertendo suavemente o tubo.
- Os dados atuais mostram que a DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Para armazenamento da DNase I (RNFD) a longo prazo, retire a solução-mãe do frasco de vidro, divida-a em alíquotas para uma única utilização (use os tubos de microcentrifugação [MCT] de 1,5 ml fornecidos com o kit; existe uma quantidade suficiente para 5 alíquotas) e armazene-os a –20 °C durante um período máximo de 9 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Não volte a congelar as alíquotas depois do seu descongelamento.
- Durante a reconstituição e criação de alíquotas de DNase I (RNFD), certifique-se de que as normas sobre a manipulação de ARN são cumpridas (Apêndice A, página 65).

* As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento de A_{260} de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com o ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedimento

1. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos com base redonda. Se forem usados outros tipos de adaptadores de tubo, os tubos podem partir-se durante a centrifugação.

2. Retire o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 ml de água livre de RNase (RNFw) ao pellet e feche o tubo utilizando uma tampa BD Hemogard secundária nova (fornecida com o kit).

Se o sobrenadante for decantado, tenha cuidado para não interferir com o pellet e seque a borda do tubo com um toalhete de papel limpo.

3. Agite no vórtex até à dissolução visível do pellet e centrifugue durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior. Retire e elimine todo o sobrenadante.

Pequenos detritos que permaneçam no sobrenadante após a agitação no vórtex, mas antes da centrifugação não irão afetar o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante irá inibir a lise e diluir o lisado e, consequentemente, afetar as condições para ligação do ARN à membrana do PAXgene.

4. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite no vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
5. Pipete a amostra para um tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml. Adicione 300 µl de tampão de ligação (BR2) e 40 µl de proteinase K (PK). Misture, agitando no vórtex durante 5 segundos e incube durante 10 minutos a 55 °C usando um incubador-agitador a 400–1400 rpm. Depois da incubação, ajuste a temperatura do incubador-agitador para 65 °C (para o passo 20).



Não misture o tampão de ligação (BR2) e a proteinase K (PK) antes de os adicionar à amostra.

6. Pipete o lisado diretamente para uma coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC; lilás) colocada num tubo de processamento (PT) de 2 ml e centrifugue durante 3 minutos à velocidade máxima (mas não excedendo 20 000 x g).



Pipete cuidadosamente o lisado para a coluna de rotação (PSC) e verifique visualmente se foi totalmente transferido.

Para evitar danos nas colunas (PSC) e nos tubos (PT), não exceda 20 000 x g.



Algumas amostras podem fluir pela coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC) sem centrifugação. Tal deve-se à baixa viscosidade de algumas amostras e não deve ser considerado como indicação de falha do produto.

7. Transfira cuidadosamente a totalidade do sobrenadante da fração do produto residual para um tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml novo sem interferir com o pellet no tubo de processamento.
8. Adicione 350 µl de etanol (96–100%, grau de pureza p.a.). Misture, agitando no vórtex e centrifugue durante breves instantes (1–2 segundos a 500–1000 x g) para eliminar gotas do interior da tampa do tubo.



A duração da centrifugação não deve exceder 1–2 segundos, dado que tal pode resultar na formação de pellets de ácidos nucleicos e na redução do rendimento do ARN total.

9. Pipete 700 µl de amostra para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC; vermelho) colocada num tubo de processamento (PT) de 2 ml e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.
10. Pipete a amostra restante para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.



Pipete cuidadosamente a amostra para a coluna de rotação (PRC) e verifique visualmente se a amostra foi totalmente transferida.

11. Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.

12. Adicione 10 µl de solução-mãe de DNase I (RNFD) a 70 µl de tampão de digestão de ADN (RDD) num tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml. Misture, agitando suavemente o tubo e centrifugue durante breves instantes para recolher líquido residual dos lados do tubo.

Se estiverem a ser processadas, por exemplo, 10 amostras, adicione 100 µl de solução-mãe de DNase I (RNFD) a 700 µl de tampão de digestão de ADN (RDD). Use os tubos de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml fornecidos com o kit.



A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura apenas deve ser efetuada agitando suavemente o tubo. Não agite no vórtex.

13. Pipete a mistura de incubação de DNase I (RNFD) (80 µl) diretamente para a membrana da coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e coloque na bancada (20–30 °C) durante 15 minutos.



Certifique-se de que a mistura de incubação de DNase I (RNFD) é colocada diretamente na membrana. A digestão da DNase poderá ser incompleta se parte da mistura for aplicada e permanecer nas paredes ou na anilha da coluna de rotação (PRC).

14. Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.

15. Pipete 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.



O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Certifique-se de que o etanol é adicionado ao tampão de lavagem 2 (BR4) antes da utilização (consulte "Passos a seguir antes de iniciar o procedimento", página 50).

16. Adicione mais 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) à coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 3 minutos a 8000–20 000 x g.

17. Elimine o tubo de processamento (PT) que contém o produto residual e coloque a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) num novo tubo de processamento (PT) de 2 ml. Centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g.

18. Elimine o tubo de processamento (PT) que contém o produto residual. Coloque a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) num tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml e pipete 40 µl de tampão de eluição (BR5) diretamente para a membrana da coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g para eluir o ARN.

É importante molhar a totalidade da membrana com tampão de eluição (BR5) para obter a máxima eficiência de eluição.

19. Repita o passo de eluição (passo 18) conforme descrito, usando 40 µl de tampão de eluição (BR5) e o mesmo tubo de microcentrifugação (MCT).

20. Incube o eluato durante 5 minutos a 65 °C no incubador-agitador (do passo 5) sem agitar. Depois da incubação, arrefeça imediatamente em gelo.

Esta incubação a 65 °C desnatura o ARN para aplicações a jusante. Não ultrapasse o tempo nem a temperatura de incubação.

21. Caso não utilize as amostras de ARN de imediato, armazene a –20 °C ou –70 °C.

Dado que o ARN se mantém desnaturado após ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, não é necessário repetir a incubação a 65 °C. Se as amostras de ARN forem utilizadas num ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para quantificação exata do ARN por medição da absorvância a 260 nm, é recomendável diluir as amostras com 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. * A diluição da amostra com água livre de RNase poderá resultar em valores muito baixos pouco fiáveis.

Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.

Nota: Para quantificação em tampão Tris-HCl, utilize a relação

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$. Consulte o Apêndice B, página 66.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

Protocolo: Purificação automatizada do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

Pontos importantes antes de iniciar o procedimento

- Certifique-se de que a caixa do kit está intacta e não se apresenta danificada e que os tampões não apresentam fugas. Não utilize um kit que esteja danificado.
- Durante a utilização de uma pipeta, certifique-se de que está definida para o volume correto e que o líquido é cuidadoso e totalmente aspirado e dispensado.
- Para evitar transferir amostras para os tubos e consumíveis plásticos errados, assegure-se de que todos os tubos de processamento (PT), tubos de microcentrifugação (MCT) e adaptadores do rotor são corretamente rotulados com uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de todos os tubos de microcentrifugação (MCT), o corpo de todos os tubos de processamento (PT) e a parede exterior de todos os adaptadores do rotor.
- Derrames acidentais de amostras e tampões durante o procedimento podem reduzir o rendimento e a pureza do ARN.
- Salvo indicação em contrário, todos os passos deste protocolo, incluindo os passos de centrifugação, devem ser efetuados à temperatura ambiente (15–25 °C).

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as seguintes precauções indicadas são necessárias quando se manipulam amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra para a base do tubo de processamento (PT) sem humedecer os bordos do tubo.
- Troque sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Use pontas de pipeta com barreira para aerossóis.
- Evite tocar na membrana da coluna de rotação (PRC, PSC) com a ponta da pipeta.

- Depois de agitar um tubo de microcentrifugação (MCT) no vórtex ou depois de o aquecer, centrifugue-o durante breves instantes para eliminar gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contacto entre as luvas e a amostra, troque imediatamente de luvas.

Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- O sangue deve ser colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*. Se for necessário, consulte o Apêndice C (página 67) para obter recomendações sobre a manipulação de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) são incubados durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente depois da colheita de sangue, para garantir a lise completa das células sanguíneas. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) de um dia para o outro pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, –20 °C ou –70 °C depois da colheita de sangue, equilibre-o primeiro até à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente durante 2 horas antes de iniciar o procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 10.
- Leia "Notas importantes" na página 38.
- Leia também as normas sobre a manipulação do ARN (Apêndice A, página 65).
- Leia o *Manual do utilizador do QIAcube* e todas as informações adicionais fornecidas com o QIAcube, prestando especial atenção às informações de segurança.
- Assegure-se de que os instrumentos, como pipetas e o QIAcube, foram verificados e calibrados regularmente, de acordo com as recomendações do fabricante.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se for necessário, aqueça a 37 °C para dissolvê-lo.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

- Se estiver a utilizar o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare uma solução-mãe de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades de Kunitz) * em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tenha cuidado para não perder DNase I (RNFD) ao abrir o frasco. Não agite a DNase I reconstituída (RNFD) no vórtex. A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser efetuada apenas invertendo suavemente o tubo.
- Os dados atuais mostram que a DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Para armazenamento da DNase I (RNFD) a longo prazo, retire a solução-mãe do frasco de vidro, divida-a em alíquotas para uma única utilização (use os tubos de microcentrifugação [MCT] de 1,5 ml fornecidos com o kit; existe uma quantidade suficiente para 5 alíquotas) e armazene-os a –20 °C durante um período máximo de 9 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Não volte a congelar as alíquotas depois do seu descongelamento.
- Durante a reconstituição e criação de alíquotas de DNase I (RNFD), certifique-se de que as normas sobre a manipulação de ARN são cumpridas (Apêndice A, página 65).
- Instale o adaptador do agitador correto (incluído com o QIAcube; use o adaptador para tubos com fecho de segurança de 2 ml, marcados com "2") e coloque o suporte do agitador em cima do adaptador.
- Inspeccione a gaveta de resíduos e esvazie-a, se necessário.
- Instale os protocolos, se isso ainda não tiver sido feito para os ensaios anteriores. Instale os protocolos "PAXgene Blood RNA Part A" e "PAXgene Blood RNA Part B". Consulte "Instalar protocolos no QIAcube", página 38.

* As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento de A_{260} de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com o ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

Procedimento

1. Feche a porta do QIAcube e ligue o QIAcube no interruptor de alimentação (consulte a Figura 15, página 39).

Ouve-se um sinal sonoro e aparece o ecrã de arranque. O instrumento efetua automaticamente testes de inicialização.

2. Abra a porta do QIAcube e carregue os reagentes e material de plástico necessários no QIAcube. Consulte "Carregar o QIAcube", página 40.

Para poupar tempo, o carregamento pode ser efetuado durante um ou ambos os passos de centrifugação de 10 minutos subsequentes (passos 3 e 5).

3. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos com base redonda. Se forem usados outros tipos de adaptadores de tubo, os tubos podem partir-se durante a centrifugação.

4. Retire o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 ml de água livre de RNase (RNFW) ao pellet e feche o tubo utilizando uma tampa BD Hemogard secundária nova (fornecida com o kit).




Se o sobrenadante for decantado, tenha cuidado para não interferir com o pellet e seque a borda do tubo com um toalhete de papel limpo.

5. Agite no vórtex até à dissolução visível do pellet e centrifugue durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior. Retire e elimine todo o sobrenadante.



Pequenos detritos que permaneçam no sobrenadante após a agitação no vórtex, mas antes da centrifugação não irão afetar o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante irá inibir a lise e diluir o lisado e, consequentemente, afetar as condições para ligação do ARN à membrana do PAXgene.

6. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite no vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
7. Pipete a amostra para um tubo de processamento (PT) de 2 ml.
 -  Use os tubos de processamento (PT) de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.
8. Carregue os tubos de processamento (PT) abertos que contêm amostra no agitador QIAcube (consulte a Figura 17, página 42). As posições da amostra estão numeradas para facilitar o carregamento. Introduza rolhas de suporte do agitador (incluídas com o QIAcube) nas ranhuras existentes na extremidade do suporte do agitador junto a cada tubo de processamento. Tal permite a detecção de amostras durante a verificação do carregamento.
 -  Certifique-se de que está instalado o adaptador do agitador correto (adaptador do agitador, 2 ml, tubos com fecho de segurança, marcados com "2", incluído com o QIAcube).
 -  Se forem processadas menos de 12 amostras, certifique-se de carregar o suporte do agitador conforme demonstrado na Figura 21, página 46. Não é possível processar uma amostra ou 11 amostras.
9. Feche a porta do instrumento QIAcube (consulte a Figura 15, página 39).
10. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" e inicie o protocolo.

Siga as instruções que surgem no ecrã tátil do QIAcube.

 -  Certifique-se de que estão instaladas as duas partes do programa (parte A e parte B) no QIAcube (consulte "Instalar protocolos no QIAcube", página 38).
 -  O QIAcube irá efetuar verificações de carregamento das amostras, pontas, adaptadores do rotor e frascos de reagente.
11. Depois do protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" terminar, abra a porta do instrumento QIAcube (consulte a Figura 15, página 39). Retire e elimine as colunas de rotação PAXgene RNA (PRC) dos adaptadores do rotor e os tubos de processamento (PT) vazios do agitador.



Durante o ensaio, as colunas de rotação são transferidas da posição 1 do adaptador do rotor (posição da tampa L1) para a posição 3 do adaptador do rotor (posição da tampa L2) pelo instrumento (consulte a Figura 19, página 44).

12. Feche as tampas de todos os tubos de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml que contêm o ARN purificado nos adaptadores do rotor (posição 3, posição da tampa L3, consulte a Figura 19, página 44). Transfira os tubos de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml para o adaptador do agitador QIAcube (consulte a Figura 17, página 42).
13. Feche a porta do instrumento QIAcube (consulte a Figura 15, página 39).
14. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA Part B" e inicie o protocolo.

Siga as instruções que surgem no ecrã tátil do QIAcube.



Este programa incuba as amostras a 65 °C e desnatura o ARN para aplicações a jusante. Mesmo que a aplicação a jusante inclua um passo de desnaturação por calor, não omita este passo. A desnaturação de ARN suficiente é essencial para a máxima eficiência em aplicações a jusante.

15. Depois do protocolo "PAXgene Blood RNA Part B" terminar, abra a porta do instrumento QIAcube (consulte a Figura 15, página 39). Coloque imediatamente os tubos de microcentrifugação (MCT) que contêm o ARN purificado em gelo.



AVISO: Superfície quente. O agitador pode atingir temperaturas até 70 °C. Evite tocar no mesmo quando estiver quente.



Não deixe o ARN purificado permanecer no QIAcube. Dado que as amostras não são arrefecidas, o ARN purificado pode degradar-se. Por conseguinte, não são recomendados ensaios de preparação de amostras sem vigilância durante a noite.

16. Caso não utilize as amostras de ARN de imediato, armazene a -20 °C ou -70 °C. Dado que o ARN permanece desnaturado após ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, não é necessário repetir o protocolo de incubação por calor

("PAXgene Blood RNA Part B"). Se as amostras de ARN forem utilizadas num ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para quantificação exata do ARN por medição da absorvância a 260 nm, é recomendável diluir as amostras em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5.* A diluição da amostra com água livre de RNase poderá resultar em valores muito baixos pouco fiáveis.

Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.



Para quantificação em tampão Tris-HCl, utilize a relação

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ } \mu\text{g/ml}$. Consulte o Apêndice B, página 66.

17. Retire o suporte de frascos de reagente da mesa de trabalho do QIAcube (consulte a Figura 17, página 42) e feche todos os frascos com tampas adequadamente rotuladas. Os tampões em frascos podem ser armazenados à temperatura ambiente (15–25 °C) durante um período máximo de 3 meses. Retire e elimine os reagentes restantes nos tubos de processamento (PT) nas ranhuras para tubos de microcentrifugação do QIAcube (consulte a Figura 17, página 42). Retire e elimine os adaptadores do rotor da centrífuga (consulte a Figura 17, página 42). Esvazie a gaveta de resíduos do QIAcube (consulte a Figura 15, página 39). Feche a porta do instrumento QIAcube e desligue o instrumento no interruptor de alimentação (consulte a Figura 15, página 39).

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução 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 Assistência Técnica: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa surgir sobre as informações e protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

ARN degradado

Contaminação de RNase



Tenha cuidado para não introduzir qualquer RNase nos reagentes durante o procedimento ou manipulação posterior (consulte o Apêndice A, página 65).

Baixo rendimento de ARN

a) Menos de 2,5 ml de sangue colhidos no PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Certifique-se de que são colhidos 2,5 ml de sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Concentração de ARN medido em água



O ARN deve ser diluído em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5* para uma quantificação precisa (consulte o Apêndice B, página 66).



c) Detritos celulares transferidos para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) nos passos 9 e 10 do protocolo manual





Evite transferir partículas de grandes dimensões ao pipetar o sobrenadante no passo 7 do protocolo manual (a transferência de pequenos detritos não irá afetar o procedimento).

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

Comentários e sugestões

- d) Sobrenadante não completamente removido no passo 3  Certifique-se de que é removida a totalidade do sobrenadante. Se o sobrenadante for decantado, elimine gotas da borda do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) absorvendo com um toalhete de papel. Tome precauções adequadas para evitar a contaminação cruzada.
- e) Depois da colheita para o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sangue é incubado durante menos de 2 horas  Incube o sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas após a colheita.

Baixo valor de A_{260}/A_{280}

- a) Água utilizada para diluir o ARN para a medição de A_{260}/A_{280}  Use 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5 para diluir o ARN antes de medir a pureza* (consulte o Apêndice B, página 66).
- b) Espectrofotômetro não foi corretamente ajustado a zero  Ajuste o espectrofotômetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotômetro não for devidamente ajustado para zero.

Avaria do instrumento

O QIAcube não funciona corretamente

Leia o *Manual do utilizador do QIAcube*, prestando especial atenção à secção de Resolução de problemas. Certifique-se de que o QIAcube é objeto de uma manutenção adequada, conforme descrito no *Manual do utilizador do QIAcube*.

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

Apêndice A: Observações genéricas sobre a manipulação do ARN

Manipulação do ARN



As ribonucleases (RNases) são enzimas extremamente estáveis e ativas, que, habitualmente, não requerem cofatores para atuar. Dado que as RNases são difíceis de inativar, e mesmo quantidades mínimas são suficientes para destruir o ARN, não use nenhum material de plástico ou vidro sem eliminar primeiro uma possível contaminação por RNase. É necessário ter extremo cuidado para evitar introduzir acidentalmente RNases na amostra de ARN durante ou após o procedimento de purificação. Para criar e manter um ambiente livre de RNase, devem tomar-se precauções durante o pré-tratamento e utilização de soluções e recipientes descartáveis e não descartáveis enquanto se trabalha com o ARN.

Manipulação geral



Ao trabalhar com o ARN, deve usar-se sempre uma técnica microbiológica adequada e asséptica. As mãos e partículas de pó transportam bactérias e fungos e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Use sempre luvas de látex ou vinil para manipular os reagentes e as amostras de ARN de modo a evitar a contaminação por RNase a partir da superfície da pele ou de equipamento de laboratório com poeira. Troque frequentemente de luvas e mantenha os tubos fechados sempre que possível. Mantenha o ARN purificado em gelo quando as alíquotas forem pipetadas para aplicações a jusante.

É possível encontrar protocolos para remoção da contaminação por RNase de material de vidro e soluções em guias gerais de biologia molecular, como Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Apêndice B: Quantificação e determinação da qualidade do ARN total

Quantificação do ARN

A concentração do ARN deve ser determinada medindo a absorvância a 260 nm (A_{260}) num espectrofotômetro. Para garantir a significância, as leituras devem estar dentro do intervalo linear do espectrofotômetro. A absorvância de 1 unidade a 260 nm corresponde a 44 µg de ARN por ml ($A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$). Esta relação só é válida para medições em 10 mM de Tris-HCl, * pH 7,5. Por conseguinte, se for necessário diluir a amostra de ARN, tal deve ser feito em 10 mM de Tris-HCl. Conforme discutido em baixo (consulte "Pureza do ARN", página 67), a relação entre os valores de absorvância a 260 e 280 nm fornece uma estimativa da pureza do ARN. Ao medir amostras de ARN, certifique-se de que as cuvets estão livres de RNase. Ajuste o espectrofotômetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotômetro não for devidamente ajustado para zero. Abaixo encontra-se um exemplo do cálculo envolvido na quantificação do ARN.

Volume da amostra de ARN	= 80 µl
Diluição (1/15)	= 10 µl da amostra de ARN + 140 µl de 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5
Absorvância medida da amostra diluída numa cuvete (livre de RNase).	
A_{260}	= 0,3
Concentração da amostra	= $44 \times A_{260} \times \text{fator de diluição}$ = $44 \times 0,3 \times 15$ = 198 µg/ml
Rendimento total	= concentração x volume da amostra em mililitros = 198 µg/ml x 0,08 ml

* Ao trabalhar com substâncias químicas, utilize sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

= 15,8 µg de ARN

Pureza do ARN

A relação das leituras a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) fornece uma estimativa da pureza do ARN no que se refere a contaminantes que são absorvidos por UV, tal como proteína. No entanto, a relação de A_{260}/A_{280} é consideravelmente influenciada pelo pH. Resultados de pH mais baixos resultam numa relação de A_{260}/A_{280} mais baixa e sensibilidade reduzida à contaminação por proteínas.* Recomenda-se medir a absorvância em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, para a obtenção de valores precisos. O ARN puro possui uma relação de A_{260}/A_{280} de 1,8–2,2 em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.

Apêndice C: Manipulação dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



As seguintes recomendações da BD podem ser úteis ao manipular PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter mais informações sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

Instruções para remoção da tampa BD Hemogard

1. Segure o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) com uma mão, colocando o polegar por baixo da tampa BD Hemogard. (Para maior estabilidade, coloque o braço numa superfície fixa.) Com a outra mão, rode a tampa BD Hemogard empurrando simultaneamente para cima com o polegar da outra mão **APENAS ATÉ AFROUXAR A ROLHA DO TUBO**.
2. Afaste o polegar antes de levantar a tampa. **NÃO** use o polegar para retirar a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Atenção: Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiver sangue, existe perigo de exposição. Para ajudar a evitar lesões durante a remoção da tampa, é importante que o polegar usado para levantar a tampa seja retirado do contacto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) assim que a tampa BD Hemogard afrouxar.
3. Retire a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Na improvável eventualidade de a proteção de plástico se separar da rolha de borracha, **NÃO VOLTE A COLOCAR A TAMPA**. Remova cuidadosamente a rolha de borracha do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

Instruções para a introdução da tampa secundária BD Hemogard

1. Substitua a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Rode e empurre firmemente para baixo até que a rolha fique completamente encaixada. A reintrodução total da rolha é necessária para que a tampa se mantenha firmemente presa no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante a manipulação.

Informações para encomendas

Produto	Conteúdo	Ref.º
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 colunas de rotação PAXgene, 50 colunas de rotação Shredder, tubos de processamento, DNase I livre de RNase e tampões e reagentes livres de RNase. A utilizar em conjunto com os PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubos de colheita de sangue	762165
Produtos relacionados que podem ser encomendados à QIAGEN		
Starter Pack, QIAcube	O pacote inclui: suportes de frascos de reagente (3); tiras para rotulagem de suportes (8); pontas com filtro de 200 µl (1024); pontas com filtro de 1000 µl (1024); pontas com filtro de 1000 µl, diâmetro amplo (1024); frascos de reagente de 30 ml (18); adaptadores do rotor (240); suporte para o adaptador do rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Pontas com filtro descartáveis esterilizadas, em suporte	990352
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Frascos de reagente (30 ml) com tampas; embalagem de 6; para utilização com o suporte de frascos de reagente QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 x 24)	Para 240 preparações: 240 adaptadores do rotor descartáveis; para utilização com o QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Suporte com capacidade para 6 frascos de reagente de 30 ml na mesa de trabalho do QIAcube	990390

Rotor Adapter Holder	Suporte para 12 adaptadores do rotor descartáveis; para utilização com o QIAcube	990392
----------------------	--	--------

Produtos relacionados que podem ser encomendados à BD*

Blood Collection Set	BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: Agulha de calibre 21G de 0,75 polegadas (0,8 x 19 mm), tubagem de 12 polegadas (305 mm) com adaptador luer; 50 por caixa, 200 por embalagem	367286
BD Vacutainer One-Use Holder	Embalagem apenas para 13 mm e 16 mm de diâmetro; 1000 por embalagem	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 x 75 mm, 4,0 ml de colheita com tampa BD Hemogard vermelha e rótulo de papel; 100 por caixa, 1000 por embalagem	368975

* Estes acessórios para colheita de sangue representam produtos típicos que podem ser usados com os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Para obter mais informações sobre estes acessórios, incluindo informações para encomendas, visite www.preanalytix.com.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncia de responsabilidades específicas do produto, consulte o manual do utilizador ou o manual do kit PreAnalytiX ou QIAGEN respetivo. Os manuais do utilizador e os manuais do kit PreAnalytiX e QIAGEN estão disponíveis em www.preanalytix.com e www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da PreAnalytiX.

Histórico de revisões do documento

Documento e revisão	Alterações	Data
HB-0101-004, R2	Alterações para garantir a conformidade com a regulamentação GHS em todo o documento	Junho de 2015
HB-0101-005, R3	Novo modelo; revisões ao protocolo automatizado e aos dados de desempenho; atualização das Informações de segurança para garantir a conformidade com a regulamentação GHS; alterações aos detalhes do instrumento e à declaração de Limitações de utilização do produto.	Fevereiro de 2019
HB-0101-006, R3	Correção do nome do kit na tabela Conteúdos do kit, página 5.	Janeiro de 2020

PreAnalytiX Worldwide

Os produtos PreAnalytiX são distribuídos pelas empresas QIAGEN e BD

Australia • Orders 03 9840 9800 • 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 0086 21 3865 3865 • Fax 0086 21 3865 3965 • Technical 800 988 0325, 800 988 0327
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 02 33430411 • Fax 02 33430426 • Technical 800 787980
Japan • Telephone 03 5547 0811 • Fax 03 5547 0818 • Technical 03 5547 0811
Korea (South) • Orders 1544 7145 • Fax 1544 7146 • Technical 1544 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 639
The Netherlands • Orders 0800 0229592 • Fax 0800 0229593 • Technical 8000 0229602
Norway • Orders 800 18859 • Fax 800 18817 • Technical 800 18712
Singapore • Orders 65 67775366 • Fax 65 67785177 • Technical 65 67775366
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)

www.qiagen.com

www.PreAnalytiX.com

Argentina, Uruguay and Paraguay • Orders 0800 444 5523
Australia • Orders 1 800 656 100 • Fax 1 800 656 110
Austria • Orders 43 1 7063660 • Fax 43 1 706366011
Belgium • Orders 32 53720556 • Fax 32 53720549
Brazil • Orders 0800 55 5654
Canada • Orders 800 268 5430 • Fax 800 565 0897
Denmark • Orders 45 43 43 45 66 • Fax 45 43 96 56 76
East Europe, Middle East & Africa (EMA) • Orders 971 4 3379525 • Fax: 971 4 03379551
Finland • Orders 358 9 88 70 780 • Fax 358 9 88 70 7816
France • Orders 33 4 76 68 36 36
Germany • Orders 49 6221 3050 • Fax 49 6221 305216
Italy • Orders 39 2 48240 500 • Fax 39 2 48240 344
The Netherlands • Orders 31 20 582 9420 • Fax 31 20 582 9421
New Zealand • Orders 0800 572 468 • Fax 0800 572 469
Spain • Orders 34 91 848 8104 • Fax 34 91 848 8115
Sweden • Orders 46 8 775 51 00 • Fax 46 8 645 08 08
Switzerland • Orders 41 61 4852224 • Fax 41 61 4852200
UK • Orders 0800 917 8776
USA • Orders 888 237 2762 • Fax 800 847 2220 • Technical 800 631 0174

www.bd.com

www.PreAnalytiX.com

