

# Istruzioni per l'uso (manuale) del QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA Blood Mini Kit



Versione 3



Per uso diagnostico in vitro

Per l'uso con QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit



61104



QIAGEN GmbH  
QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANIA



1127543IT

# Indice

Uso previsto .....	4
Utente previsto .....	4
Descrizione e principio .....	5
Lisi delle cellule di sangue .....	5
Legame del DNA genomico alla membrana della colonna spin QIAamp Mini .....	5
Rimozione dei residui contaminanti .....	6
Eluizione di DNA genomico puro .....	6
Resa e qualità del DNA genomico .....	7
Purificazione automatizzata su QIAcube Connect MDx .....	7
Sommario e spiegazioni .....	10
Materiali in dotazione .....	11
Contenuto del kit .....	11
Componenti del kit .....	12
Materiali necessari ma non in dotazione .....	13
Reagenti aggiuntivi .....	13
Materiali di consumo .....	13
Strumentazione .....	13
Solo per la procedura sottovuoto .....	13
Solo per la procedura automatizzata .....	14
Avvertenze e precauzioni .....	15
Informazioni sulla sicurezza .....	15
Precauzioni .....	16

Smaltimento .....	17
Conservazione e manipolazione dei reagenti .....	18
Stabilità durante l'uso .....	18
Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni.....	19
Note importanti .....	21
Punti importanti prima di iniziare un protocollo .....	21
Preparazione di reagenti e tamponi .....	22
Manipolazione delle colonne spin QIAamp Mini .....	23
Impostazione dell'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus .....	24
Procedura .....	26
Protocollo: isolamento e purificazione di DNA genomico da campioni di sangue mediante utilizzo di una microcentrifuga/purificazione automatizzata su QIAcube Connect MDx .....	26
Protocollo: isolamento e purificazione di DNA genomico da campioni di sangue mediante utilizzo di un apparato da vuoto .....	31
Controllo di qualità .....	35
Limitazioni .....	36
Caratteristiche delle prestazioni .....	37
Guida alla risoluzione dei problemi .....	38
Simboli .....	42
Informazioni per gli ordini .....	45
Cronologia delle revisioni del documento .....	47

## Uso previsto

Il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione del DNA genomico da campioni biologici.

Il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit è destinato alla diagnostica in vitro.

## Utente previsto

Questo prodotto è destinato all'uso da parte di utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti nelle tecniche di biologia molecolare.

# Descrizione e principio

Ogni procedura del QIAamp DSP DNA Blood Mini comprende 4 fasi:

- Lisi delle cellule nel campione di sangue
- Legame del DNA genomico presente nel lisato cellulare alla membrana di una colonna spin QIAamp Mini
- Lavaggio della membrana
- Eluizione del DNA genomico dalla membrana

Questo manuale comprende i protocolli relativi a due procedure alternative del QIAamp DSP DNA Blood Mini: la procedura di centrifugazione, che richiede una centrifuga o che può essere automatizzata sul QIAcube® Connect MDx (Figura 1), e quella sottovuoto, per la quale occorrono una centrifuga e un apparato da vuoto (consultare il diagramma di flusso, pag. 9).

## Lisi delle cellule di sangue

I campioni vengono lisati in condizioni denaturanti a temperature elevate. La lisi viene eseguita in presenza della QIAGEN® Protease (QP) e tampone di lisi (AL).

## Legame del DNA genomico alla membrana della colonna spin QIAamp Mini

Per ottimizzare il legame del DNA genomico alla membrana della colonna spin QIAamp Mini, si inizia aggiungendo etanolo ai lisati. Successivamente, si applica il lisato a una colonna spin QIAamp Mini e il DNA genomico viene assorbito sulla membrana di silice per effetto della pressione indotta dal vuoto o della forza centrifuga.

## Rimozione dei residui contaminanti

Mentre il DNA genomico rimane legato alla membrana della colonna spin QIAamp Mini, i contaminanti vengono rimossi efficacemente dal lavaggio eseguito prima con il tampone di lavaggio 1 (AW1) e successivamente con il tampone di lavaggio 2 (AW2).

## Eluizione di DNA genomico puro

Il DNA genomico viene eluito dalla membrana della colonna spin QIAamp Mini utilizzando 50–200 µl di tampone di eluizione (AE). Il DNA eluito può essere utilizzato in numerose esami downstream, compresi diversi tipi di esami diagnostici downstream in vitro. Lasciare equilibrare il tampone di eluizione (AE) a temperatura ambiente (15–25°C) prima di applicarlo alla colonna.

A causa del tampone di eluizione trattenuto dalla membrana della colonna spin dopo la centrifugazione, il volume di eluito recuperato può essere inferiore al volume del tampone di eluizione (AE) applicato alla colonna. Il volume dell'eluito ottenuto dipende dalla natura del campione. Il DNA eluito viene raccolto in provette di eluizione (ET) e può essere conservato a 2–8°C per massimo 4 settimane. Sugeriamo una conservazione a –20°C per la conservazione a lungo termine.

**Nota:** La stabilità degli eluiti dipende molto da vari fattori ed è correlata all'applicazione downstream specifica. La stabilità è stata valutata per il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit in combinazione con applicazioni downstream ideali. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel suo laboratorio e/o di convalidare l'intero flusso di lavoro per determinare le condizioni di conservazione appropriate.

## Resa e qualità del DNA genomico

La resa del DNA dipende dal campione e dalla qualità del materiale di partenza. L'eluizione eseguita in volumi inferiori aumenta in modo significativo la concentrazione del DNA finale nell'eluato, ma riduce leggermente il DNA complessivo ottenuto. Si consiglia di utilizzare un volume di eluizione adeguato alla prevista applicazione a valle.

La resa e la qualità del DNA genomico isolato sono adeguate per procedure di determinazione downstream utilizzate in diagnostica molecolare, ad esempio la PCR. Eseguire i test diagnostici attenendosi alle istruzioni dei produttori.

## Purificazione automatizzata su QIAcube Connect MDx

QIAcube Connect MDx esegue l'isolamento e la purificazione automatizzati degli acidi nucleici. Può elaborare in continuo un massimo di 12 campioni a sessione.

Per la preparazione dei campioni con il QIAcube Connect MDx, è necessario seguire le stesse fasi della procedura manuale (ossia, lisi, legame, lavaggio, eluizione) che permettono di continuare a usare il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit per la purificazione di DNA di alta qualità.

Se viene eseguita l'automazione del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sul QIAcube Connect MDx, quest'ultimo consente di processare non più di 50 campioni, a causa dei volumi morti, dell'evaporazione e dell'ulteriore consumo di reagenti da parte del prelievo automatizzato. QIAGEN garantisce soltanto 50 preparazioni di campioni con l'uso manuale del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.



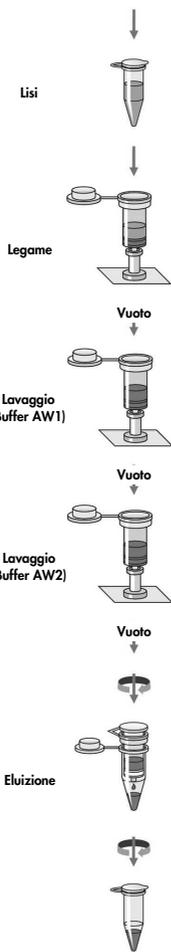
Figura 1. QIAcube Connect MDx.

## Procedure di centrifugazione e sottovuoto con il QIAamp DSP DNA Blood Mini

### Procedura di centrifugazione con QIAamp Campione



### Procedura sottovuoto con QIAamp Campione



Prima di iniziare, leggere attentamente i protocolli (pagg. 26 e 31).

Nella provetta di lisi, aggiungere 20 µl di QP, 200 µl di campione e 200 µl di AL. Agitare su vortex per 15 s. Incubare per 10 min a 56°C. Aggiungere 200 µl di etanolo. Agitare su vortex per 15 s.

Trasferire il lisato alla colonna spin QIAamp Mini. Procedura di centrifugazione: Centrifugare per 1 minuto a 6000 x g.

Procedura sottovuoto: applicare il vuoto.

Procedura di centrifugazione: posizionare la colonna spin QIAamp Mini in un nuovo WT, aggiungere 500 µl di AW1 e centrifugare per 1 minuto a 6000 x g.

Procedura sottovuoto: aggiungere 750 µl di AW1 e applicare il vuoto.

Procedura di centrifugazione: posizionare la colonna spin QIAamp Mini in un nuovo WT, aggiungere 500 µl di AW2 e centrifugare per 1 min alla velocità massima (circa 20.000 x g o 14.000 rpm).

Procedura sottovuoto: aggiungere 750 µl di AW2 e applicare il vuoto..

Posizionare la colonna spin QIAamp Mini nel WT.

Centrifugare per 3 minuti alla velocità massima (circa 20.000 x g o 14.000 rpm).

Posizionare la colonna spin QIAamp Mini nel ET.

Aggiungere 50–200 µl di AE e incubare per 1 minuto.

Centrifugare per 1 minuto a 6000 x g.

## Sommario e spiegazioni

Il QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit utilizza una tecnologia consolidata per offrire un metodo semplice e rapido per isolare e purificare il DNA genomico da 200 µl di sangue intero.

Le procedure del QIAamp DSP DNA Blood Mini concepite per processare simultaneamente più campioni di sangue forniscono DNA purificato, pronto per l'uso. Queste procedure possono essere utilizzate con sangue intero, appena prelevato o congelato, e sangue trattato con citrato o EDTA.

Non è necessaria alcuna separazione preliminare dei leucociti. Le procedure non richiedono né l'estrazione con fenolo/cloroformio, né la precipitazione con alcool; inoltre, poiché occorre solo il minimo intervento da parte dell'operatore, garantiscono la gestione sicura dei campioni potenzialmente infetti. Tali procedure sono concepite per evitare la contaminazione crociata dei campioni. Il DNA purificato è pronto per essere utilizzato nella reazione di PCR o in altre applicazioni oppure, in alternativa, può essere conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  per la conservazione a lungo termine.

Le semplici procedure di centrifugazione e sottovuoto del QIAamp DSP sono indicate per processare simultaneamente più campioni. Alcune delle procedure di centrifugazione del QIAamp possono essere interamente automatizzate sul sistema QIAcube Connect MDx per garantire una migliore standardizzazione e una maggiore facilità d'uso (pag. 7).

Per il protocollo della procedura sottovuoto sono richiesti un collettore da vuoto (ad esempio, il QIAvac 24 Plus con QIAvac Connecting System) e una pompa da vuoto in grado di produrre un vuoto di  $\sim 800\text{--}900$  mbar (ad esempio, QIAGEN Vacuum Pump). Per monitorare con semplicità la pressione indotta dal vuoto e consentire un comodo rilascio del vuoto si raccomanda di utilizzare un Vacuum Regulator (componente del QIAvac Connecting System).

# Materiali in dotazione

## Contenuto del kit

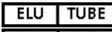
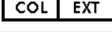
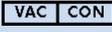
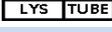
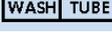
### QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

Numero di catalogo

61104

Numero di preparazioni

50

	Identità	Simboli	Quantità
5	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (colonne spin QIAamp Mini con provette di lavaggio) (WT) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)	 	50
VC	VacConnectors (VacConnector)		50
LT	Lysis Tubes (Provette di lisi) (1,5 ml)		50
WT	Wash Tubes (Provette di lavaggio) (2 ml)		3 x 50
AL	Lysis Buffer* (Tampone di lisi)		12 ml
AW1	Wash Buffer 1 <sup>†</sup> (concentrate) (Tampone di lavaggio 1 [concentrato])		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 <sup>†</sup> (concentrate) (Tampone di lavaggio 2 [concentrato])		13 ml
AE	Elution Buffer <sup>‡</sup> (Tampone di eluizione)		25 ml
PS	Protease Solvent <sup>‡</sup> (Solvente della proteasi)		2 ml
QP	QIAGEN Protease <sup>§</sup> (QIAGEN proteasi)		1 fiala
-	Istruzioni per l'uso (manuale)		1

\* Se viene eseguita l'automazione del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sullo strumento QIAcube Connect MDx, quest'ultimo consente di processare non più di 50 campioni, a causa dei volumi morti, dell'evaporazione e dell'ulteriore consumo di reagenti da parte del prelievo automatizzato. QIAGEN garantisce soltanto 50 preparazioni di campioni con l'uso manuale del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit.

<sup>†</sup> Contiene guanidina cloridrato. Non compatibile con disinfettanti contenenti candeggina. Per maggiori informazioni, vedere Informazioni sulla **sicurezza** a pagina 15.

<sup>‡</sup> Contiene azide di sodio come conservante.

<sup>§</sup> Volume di risospensione 1,2 ml. Vedere "Preparazione di reagenti e tamponi" a pagina 22.

## Componenti del kit

I principali componenti del kit contenente i principi attivi sono illustrati di seguito.

<b>Reagente</b>	<b>Principi attivi</b>	<b>Concentrazione (w/w) [%]</b>
QIAGEN Protease	Subtilisina	tra $\geq 0$ e $\leq 100$
AL	Guanidina cloridrato Acido maleico	tra $\geq 30$ e $< 50$ tra $\geq 0,1$ e $< 1$
AW1	Guanidina cloridrato	tra $\geq 50$ e $< 70$

# Materiali necessari ma non in dotazione

## Reagenti aggiuntivi

- Etanolo (96-100%)\*

## Materiali di consumo

- Pipette† e relativi puntali (per evitare la contaminazione crociata, si raccomanda vivamente di utilizzare puntali con barriere anti-aerosol)
- Guanti monouso

## Strumentazione

- Blocco riscaldante† per la lisi dei campioni a 56°C (per microprovette da 1,5 ml)
- Microcentrifuga†
- Cilindro graduato (50 ml)
- Agitatore Vortex

## Solo per la procedura sottovuoto

- Sistema sottovuoto QIAvac 24 Plus (n. cat. 19413) o sistema equivalente†
- VacValves (n. cat. 19408)
- QIAvac Connecting System (n. cat. 19419)
- Vacuum Pump (n. cat. 84020)
- Vacuum Regulator (n. cat. 19530)

\* Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone.

† Per assicurarsi che i campioni vengano processati adeguatamente con le procedure del QIAamp DSP DNA Blood Mini, si raccomanda di utilizzare strumenti (ad es., pipette e blocchi riscaldanti) controllati e calibrati secondo le indicazioni dei produttori.

## Solo per la procedura automatizzata

- Strumento QIAcube Connect MDx( n. cat. 9003070) \*
- Rotor Adapters (n. cat. 990394)
- Rotor Adapter Holder (n. cat. 990392)
- Sample Tubes CB (n. cat. 990382; provetta di ingresso campione)
- Shaker Rack Plugs (n. cat. 9017854)
- Reagent Bottles, 30 ml, (n. cat. 990393)
- Filter-Tips, 1000  $\mu$ l (n. cat. 990352)
- Filter-Tips, 200  $\mu$ l (n. cat. 990332)
- SafeSeal Tube, 1,5 ml (Sarstedt®, n. cat. 72.706)

\* Per assicurarsi che i campioni vengano processati adeguatamente con le procedure del QIAamp DSP DNA Blood Mini, si raccomanda di utilizzare strumenti (ad es., pipette e blocchi riscaldanti) controllati e calibrati secondo le indicazioni dei produttori.

## Avvertenze e precauzioni

Tenere presente che potrebbe essere richiesto di consultare le norme locali per la segnalazione al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità di regolamentazione del Paese dell'utente e/o del paziente di gravi incidenti verificatisi in relazione al dispositivo.

Per uso diagnostico in vitro.

Leggere attentamente tutte le istruzioni prima di utilizzare il kit.

### Informazioni sulla sicurezza

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS sono disponibili in formato PDF online all'indirizzo [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), dove è possibile trovare, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

<p><b>CAUTELA</b></p> 	<p>NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.</p>
--	--

- Il tampone di lisi (AL) e il tampone di lavaggio 1 (AW1) contengono guanidina cloridrato, che può formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina. Se si rovescia il liquido di questi tamponi, pulire con acqua e detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido rovesciato contiene agenti potenzialmente infetti, pulire l'area interessata, prima con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v). Se i flaconi di tampone sono danneggiati o si riscontrano perdite, indossare guanti e occhiali di protezione al momento del loro smaltimento, onde evitare lesioni personali a sé o ad altri.

- QIAGEN non ha testato i liquidi di scarico generati dalle procedure QIAamp DSP DNA Blood Mini per la presenza di materiali infetti residui. La contaminazione dei liquidi di scarico da parte di materiali infetti residui è improbabile, ma non può essere esclusa completamente. Pertanto, i liquidi di scarico devono essere considerati infetti e smaltiti in conformità alle normative di sicurezza locali.
- I campioni sono potenzialmente infettivi. Smaltire campioni e materiali di scarto dell'esame nel rispetto delle procedure di sicurezza locali.

## Informazioni di emergenza

CHEMTREC

USA e Canada 1-800-424-9300

Al di fuori di USA e Canada +1 703-527-3887

## Precauzioni

Ai componenti del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit sono associate frasi di rischio e consigli di prudenza:

### Buffer AL



Contiene: guanidina cloridrato e acido maleico. Avvertenza! Può essere nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Può provocare una reazione allergica cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. In caso di malore, contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

### Buffer AW1



Contiene: guanidina cloridrato. Avvertenza! Nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. Togliere gli indumenti contaminati e lavarli prima di riutilizzarli. Smaltire il prodotto/recipiente in un impianto ufficialmente approvato per lo smaltimento dei rifiuti.

## QIAGEN Protease



Contiene: subtilisina. Pericolo! Nocivo se ingerito. Causa irritazione cutanea. Causa grave danno oculare. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Può essere irritante per le vie respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti protettivi/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

## Smaltimento

I materiali di scarto contengono campioni e reagenti. Tali materiali di scarto possono contenere materiali tossici o infettivi, pertanto devono essere opportunamente smaltiti. Consultare le normative di sicurezza locali per le corrette procedure di smaltimento.

Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede SDS in formato PDF sono disponibili online all'indirizzo [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety). Qui è possibile reperire, visualizzare e stampare la scheda SDS per ciascun kit QIAGEN e i relativi componenti.

# Conservazione e manipolazione dei reagenti

Prestare attenzione alle date di scadenza e alle condizioni di conservazione stampate sulla confezione e sulle etichette di tutti i componenti. Non utilizzare componenti scaduti o conservati in modo scorretto.

Le colonne spin QIAamp Mini devono essere conservate a 2–8°C al momento della consegna e possono essere utilizzate fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

Nota: Per garantire che i componenti del kit non vengano mescolati con quelli di altri kit, etichettare le colonne spin QIAamp Mini con il numero di lotto del rispettivo kit.

Tutti i tamponi possono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C) fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit.

La QIAGEN Protease (QP) liofilizzata può essere conservata a temperatura ambiente (15–25°C) fino alla data di scadenza senza alcuna perdita di prestazioni.

## Stabilità durante l'uso

La QIAGEN Protease (QP) ricostituita è stabile fino a un anno, se conservata a 2–8°C, ma comunque non oltre la data di scadenza del kit. Evitare di tenere a temperatura ambiente per lunghi periodi la soluzione concentrata di QIAGEN Protease (QP).

Il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito e il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito sono stabili fino a un anno se conservati a temperatura ambiente (15–25°C), ma solo fino alla data di scadenza.

Per la preparazione di tamponi per la procedura automatizzata, attenersi alle istruzioni contenute nel *Manuale utente di QIAcube Connect MDx* (disponibile nella scheda delle risorse della pagina del prodotto [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

# Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni

Nota: La stabilità del campione dipende molto da vari fattori ed è correlata alla specifica applicazione downstream. È stata valutata con applicazioni downstream ideali. È responsabilità dell'utente consultare le istruzioni per l'uso della specifica applicazione downstream utilizzata nel suo laboratorio e/o di convalidare l'intero flusso di lavoro per determinare le condizioni di conservazione appropriate.

Per le raccomandazioni generali in merito alla raccolta, al trasporto e alla conservazione, fare riferimento alla Direttiva CLSI approvata MM13-A "Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods" (Raccolta, trasporto, preparazione e conservazione di campioni per metodi molecolari). Durante la preparazione, la conservazione, il trasporto e la manipolazione generale dei campioni, attenersi inoltre alle istruzioni del produttore del dispositivo di raccolta dei campioni scelto. A prescindere dalle istruzioni del produttore della provetta di raccolta per il prelievo ematico, occorre tenere conto anche della ISO 20186-2:2019 (E) per l'estrazione del DNA genomico da sangue intero venoso.

Nota: Secondo la ISO 20186-2:2019(E), le provette di raccolta dell'eparina dal sangue possono influire sulla purezza degli acidi nucleici isolati e il probabile carryover negli eluiti potrebbe causare inibizioni in alcune applicazioni downstream. Si raccomanda quindi di utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA o citrato come coagulante.

Se si utilizzano campioni di sangue fresco in provette primarie, miscelare accuratamente i campioni di sangue (ad es. capovolgendo più volte le provette) prima di trasferirli. I campioni congelati (con massimo 3 cicli di congelamento-decongelamento) devono essere scongelati rapidamente in un bagno d'acqua a 37°C con una leggera agitazione per garantire un'accurata miscelazione e poi portati a temperatura ambiente (15–25°C) prima di iniziare la procedura. Non utilizzare campioni di sangue congelati e scongelati più di 3 volte. Per garantire un corretto trasferimento dei campioni, evitare la formazione di schiuma nelle provette dei campioni. Cercare di evitare la formazione di coaguli di sangue nei campioni e trasferire il campione senza coaguli. I crioprecipitati che si formano durante lo scongelamento di campioni congelati ostruiscono la membrana della colonna spin QIAamp Mini o potrebbero compromettere la procedura automatizzata sul QIAcube Connect MDx. Se sono visibili crioprecipitati, evitare di aspirarli.

La resa e la qualità del DNA purificato dipendono dalle condizioni di conservazione del sangue. I campioni di sangue più freschi possono produrre risultati migliori. Per una conservazione a breve termine (fino a 10 giorni) si raccomanda di conservare le provette a 2–8°C. Tuttavia, per le applicazioni che richiedono le dimensioni massime di frammento, quali il Southern blotting, si consiglia una conservazione a 2–8°C per massimo 3 giorni, in quanto dopo questo periodo si registrano bassi livelli di degradazione del DNA. Per una conservazione a lungo termine (oltre 10 giorni), occorre raccogliere il sangue in provette contenenti un anticoagulante standard (preferibilmente EDTA, se è richiesto DNA ad elevato peso molecolare) e conservare le provette a –20 o –80°C.

# Note importanti

## Punti importanti prima di iniziare un protocollo

- Dopo la ricezione, verificare che i componenti del kit non siano danneggiati. Se le confezioni blister o i flaconi di tampone appaiono danneggiati, rivolgersi ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale. In caso di fuoriuscita di liquidi, fare riferimento a "Informazioni sulla sicurezza" (pag. 15). Non utilizzare componenti del kit danneggiati, poiché potrebbero limitare il rendimento del kit.
- Fra un trasferimento di liquido e l'altro, sostituire sempre i puntali delle pipette. Per limitare al minimo il rischio di contaminazione crociata, si consiglia di utilizzare puntali per pipetta con barriera aerosol anticontaminazione.
- Utilizzare sempre guanti monouso durante l'intera procedura e controllare regolarmente che non siano contaminati con materiale dei campioni. Se i guanti risultano contaminati, eliminarli.
- Per limitare al minimo il rischio di contaminazione crociata, aprire soltanto una provetta per volta.
- Dopo tutte le fasi di centrifugazione con vortex a pulsazione, centrifugare brevemente le provette per microcentrifuga per eliminare le gocce dall'interno dei tappi. L'utente deve prestare attenzione a mantenere sempre la tracciabilità dei campioni durante l'intero processo.
- Tutte le fasi di centrifugazione hanno luogo a temperatura ambiente (15–25°C).
- Non utilizzare contemporaneamente componenti di più kit per la stessa procedura, a meno che i numeri di lotto non siano identici.
- Evitare la contaminazione microbica dei reagenti del kit.
- Per ridurre al minimo il rischio di infezione dovuto a materiale potenzialmente infetto, si raccomanda di operare in condizioni di flusso d'aria laminare finché non ha avuto luogo la lisi dei campioni.
- Il kit deve essere utilizzato esclusivamente da personale esperto nelle pratiche di laboratorio per la diagnostica in vitro.

## Preparazione di reagenti e tamponi

- Preparazione della QIAGEN Protease

Aggiungere 1,2 ml di solvente della proteasi (PS) alla fiala di QIAGEN Protease (QP) liofilizzata e miscelare con attenzione. Per evitare la formazione di schiuma, miscelare capovolgendo la fiala diverse volte. Assicurarsi che la QIAGEN Protease (QP) sia completamente disciolta.

**Importante:** Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).

- Preparazione del tampone di lavaggio 1

Utilizzando un cilindro graduato, aggiungere 25 ml di etanolo (96–100%) al flacone contenente 19 ml di tampone di lavaggio 1 (AW1) concentrato. Conservare il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito a temperatura ambiente (15–25°C).

**Importante:** Miscelare sempre il tampone di lavaggio 1 (AW1) ricostituito, capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.

- Preparazione del tampone di lavaggio 2

Utilizzando un cilindro graduato, aggiungere 30 mL di etanolo (96–100%) al flacone contenente 13 mL di tampone di lavaggio 2 (AW2) concentrato. Conservare il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito a temperatura ambiente (15–25°C).

**Importante:** miscelare sempre il tampone di lavaggio 2 (AW2) ricostituito capovolgendo il flacone più volte prima di iniziare la procedura.

- Preparazione del tampone di eluizione

Il kit contiene un flacone di tampone di eluizione (AE). Per evitare la contaminazione del tampone di eluizione (AE), durante il prelievo del tampone di eluizione (AE) dal flacone si raccomanda di utilizzare puntali per pipetta dotati di barriere anti-aerosol e di chiudere il tappo del flacone immediatamente dopo l'utilizzo.

**Importante:** Il tampone di eluizione (AE) contiene azide di sodio, un conservante con assorbanza a 260 nm. Pertanto, se si quantifica il DNA nell'eluato tramite la misurazione dell'assorbanza a 260 nm o si determina il grado di purezza del DNA nell'eluato tramite misurazioni dell'assorbanza a 260 e a 280 nm o si esegue la scansione dell'assorbanza nel range tra 220 e 350 nm, assicurarsi che il bianco contenga la stessa concentrazione di azide di sodio dell'eluato. Ad esempio, se si prepara l'eluato per le misurazioni dell'assorbanza diluendo 50 µl di eluito con 100 µl di acqua, occorre preparare il bianco diluendo 50 µl di tampone di eluizione (AE) con 100 µl di acqua. Per le diluizioni, usare acqua distillata appena preparata.

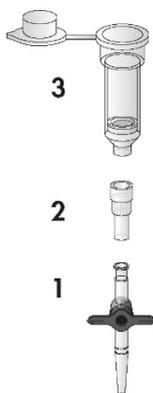
## Manipolazione delle colonne spin QIAamp Mini

A causa della sensibilità delle tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici, osservare le seguenti precauzioni per la manipolazione delle colonne spin QIAamp Mini per evitare la contaminazione crociata tra le preparazioni dei campioni:

- Applicare con cura il campione o la soluzione alla colonna spin QIAamp Mini. Pipettare il campione nella colonna spin QIAamp Mini senza bagnare il bordo della colonna.
- Evitare di toccare la membrana della colonna spin QIAamp Mini con il puntale per pipetta.
- Aprire una sola colonna spin QIAamp Mini per volta, facendo attenzione a non generare aerosol.

## Impostazione dell'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus

Assicurarsi di impostare correttamente la colonna spin QIAamp Mini, il VacConnector (VC) e la VacValve (vedere Figura 2).



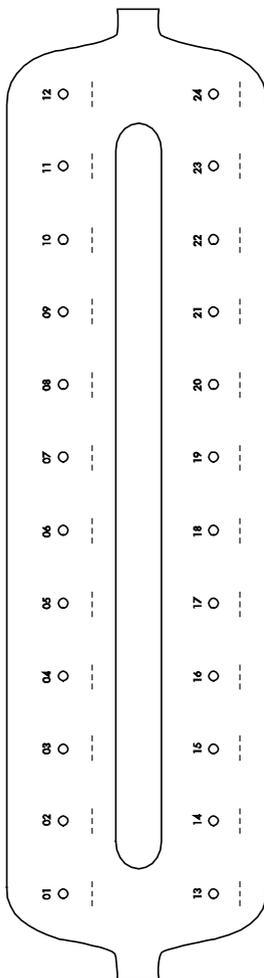
**Figura 2. Montaggio dei componenti del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit per l'estrazione sottovuoto dei campioni.**  
(1) VacValve, (2) VacConnector (VC), e (3) colonna spin QIAamp Mini.

Se si utilizza la procedura sottovuoto con l'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus, si raccomanda di etichettare le provette di lisi (LT), le provette di eluizione (ET) e le colonne spin QIAamp Mini secondo lo schema in Figura 3 (vedere pagina seguente), per evitare di confondere i campioni. Per praticità, è possibile fotocopiare la figura e apporvi le etichette dei nomi dei campioni. Si raccomanda di ricorrere a uno schema analogo se si impiegano altri apparati da vuoto o se si utilizza la procedura di centrifugazione.

Data: \_\_\_\_\_

Operatore: \_\_\_\_\_

ID esecuzione: \_\_\_\_\_



**Figura 3.** Schema di etichettatura per provette di lisi (LT), provette di eluizione (ET) e colonne spin QIAamp Mini da utilizzare nel sistema sottovuoto QIAvac 24 Plus.

# Procedura

## Protocollo: isolamento e purificazione di DNA genomico da campioni di sangue mediante utilizzo di una microcentrifuga/purificazione automatizzata su QIAcube Connect MDx

Per isolare e purificare DNA genomico da campioni di 200 µl di sangue intero trattati con EDTA o citrato utilizzando una microcentrifuga oppure con procedura automatizzata su QIAcube Connect MDx.

### Punti importanti prima di iniziare

- La seguente procedura fornisce istruzioni per elaborare un singolo campione di sangue. È tuttavia possibile elaborare vari campioni simultaneamente; il numero dipende dalla capacità della microcentrifuga impiegata.
- L'elaborazione automatica di 2–10 o 12 campioni si può eseguire sullo strumento QIAcube Connect MDx.
- Per l'automazione, attenersi alle istruzioni sull'interfaccia utente (QIAcube Connect MDx) e fare riferimento al *Manuale utente di QIAcube Connect MDx* (disponibile nella scheda delle risorse della pagina dei prodotti [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

### Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Lasciar equilibrare i campioni di sangue a temperatura ambiente e assicurarsi che siano adeguatamente miscelati.
- Assicurarsi che tutti i reagenti e le colonne spin QIAamp Mini (in blister chiusi) siano equilibrati a temperatura ambiente.
- Impostare un blocco riscaldante a 56°C per prepararlo all'uso nel passaggio 4 (richiesto per la procedura manuale e la procedura automatizzata con lisi off-board manuale).

- Assicurarsi che il tampone di lavaggio 1 (AW1), il tampone di lavaggio 2 (AW2) e la QIAGEN Protease (QP) siano stati preparati secondo le istruzioni fornite nella sezione "Preparazione di reagenti e tamponi" a pagina 22.
- Se si è formato un precipitato nel tampone di lisi (AL), scioglierlo con un'incubazione a 56°C.
- Le procedure di controllo qualità di QIAGEN comprendono l'esecuzione di test funzionali per il rilascio dei kit condotti sui singoli lotti di kit. Pertanto non miscelare reagenti appartenenti a lotti di kit diversi e non unire singoli reagenti provenienti da lotti di reagenti diversi.

## Procedura

- Per la procedura manuale con una microcentrifuga attenersi ai passaggi 1–15 di seguito.
  - Questa procedura può essere automatizzata in 3 diverse versioni:
    - Volume di eluzione: 100 µl completamente automatizzata (automazione iniziata dal passaggio 1)
    - Volume di eluzione: 200 µl completamente automatizzata (automazione iniziata dal passaggio 1)
    - Lisi manuale: parzialmente automatizzata con lisi off-board manuale e volumi di eluzione di 100–200 µl in incrementi di 10 µl (automazione iniziata dal passaggio 5)
1. Pipettare 20 µl di QIAGEN Protease (QP) in una provetta di lisi (LT).
    - ⓘ Prima dell'uso, controllare la data di scadenza della proteasi ricostituita.
  2. Aggiungere 200 µl di sangue intero alla provetta di lisi (LT).
  3. Aggiungere 200 µl di tampone di lisi (AL) alla provetta di lisi (LT), chiudere il tappo della provetta e miscelare il campione mediante utilizzo di un vortex a pulsazione per ≥ 15 secondi.

- i** Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone di lisi (AL), in modo da ottenere una soluzione omogenea.
  - i** Poiché il tampone di lisi (AL) presenta un'elevata viscosità, assicurarsi di aggiungere il volume appropriato di tampone di lisi (AL) pipettando accuratamente o utilizzando una pipetta adeguata.
  - i** Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).
4. Incubare a 56°C per 10 minuti.
  5. Centrifugare la provetta di lisi (LT) per  $\geq 5$  s alla velocità massima per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
    - i** Se la lisi manuale (passaggi 1–5) è stata effettuata off-board, è possibile automatizzare i seguenti passaggi (6–15) su QIAcube o QIAcube Connect MDx utilizzando il protocollo per la lisi manuale.
  6. Aggiungere 200  $\mu$ l di etanolo (96–100%) alla provetta di lisi (LT), chiudere il tappo della provetta e miscelare il campione mediante utilizzo di un vortex a pulsazione per  $\geq 15$  s.
  7. Centrifugare la provetta di lisi (LT) per  $\geq 5$  s alla velocità massima per rimuovere le gocce all'interno del tappo della provetta.
  8. Applicare con cura l'intero lisato del passaggio 7 alla colonna spin QIAamp Mini, senza bagnarne il bordo. Evitare di toccare la membrana della colonna spin QIAamp Mini con il puntale per pipetta.
    - i** Se si elaborano vari campioni, aprire solo una provetta di lisi (LT) per volta.
  9. Chiudere il tappo della colonna spin QIAamp Mini e centrifugare a circa 6000  $\times g$  per 1 min. Posizionare la colonna spin QIAamp Mini in una provetta di lavaggio (WT) pulita, quindi eliminare la provetta contenente il filtrato.
    - i** se il lisato non è passato completamente attraverso la membrana dopo la centrifugazione a 6.000  $\times g$  (8.000 rpm), centrifugare di nuovo alla velocità massima (fino a 20.800  $\times g$ ) per 1 minuto.

**i** se il lisato continua a non passare attraverso la membrana durante la centrifugazione, eliminare il campione e ripetere l'isolamento e la purificazione con nuovi campioni iniziando dal passaggio 1 a pag. 27.

10. Aprire con cura la colonna spin QIAamp Mini e aggiungere 500 µl di tampone di lavaggio 1 (AW1), senza bagnare il bordo. Evitare di toccare la membrana della colonna spin QIAamp Mini con il puntale per pipetta.

11. Chiudere il tappo della colonna spin QIAamp Mini e centrifugare a circa 6000 x g per 1 min. Posizionare la colonna spin QIAamp Mini in una provetta di lavaggio (WT) pulita, quindi eliminare la provetta contenente il filtrato.

12. Aprire con cura la colonna spin QIAamp Mini e aggiungere 500 µl di tampone di lavaggio 2 (AW2), senza bagnare il bordo. Evitare di toccare la membrana della colonna spin QIAamp Mini con il puntale per pipetta.

13. Chiudere il tappo della colonna spin QIAamp Mini e centrifugare alla velocità massima (circa 20.000 x g o 14.000 rpm) per 1 minuto. Posizionare la colonna spin QIAamp Mini in una provetta di lavaggio (WT) pulita, quindi eliminare la provetta contenente il filtrato.

Centrifugare alla velocità massima (circa 20.000 x g o 14.000 rpm) per 3 minuti, in modo da asciugare la membrana completamente.

**i** Se la membrana non viene asciugata per centrifugazione, potrebbe risultare impossibile eseguire l'esame downstream.

14. Posizionare la colonna spin QIAamp Mini in una provetta di eluizione (ET) pulita ed eliminare la provetta di lavaggio (WT) contenente il filtrato. Aprire con cura il tappo della colonna spin QIAamp Mini e applicare da 50 a 200 µl di tampone di eluizione (AE) al centro della membrana.

**i** È importante utilizzare una provetta di eluizione nuova per evitare la contaminazione con tamponi di lavaggio residui, che potrebbe inibire l'esame downstream.

- ① Che il tampone di eluizione (AE) sia erogato al centro della membrana è importante soprattutto quando si tratta di volumi di eluizioni più piccoli, al fine di garantire un recupero ottimale degli acidi nucleici e del tampone di eluizione (AE).

15. Chiudere il tappo della provetta e incubare a temperatura ambiente per 1 min.

Centrifugare a circa  $6000 \times g$  (8000 rpm) per 1 min, in modo da eluire il DNA.

- ① Orientare i coperchi delle provette di eluizione in modo che siano rivolti nel senso opposto alla rotazione del rotore (ad esempio, se il rotore ruota in senso orario, orientare i coperchi in senso antiorario).
- ① nel caso in cui tutte le procedure siano automatizzate, rimuovere gli eluiti dallo strumento direttamente dopo la fine del ciclo e conservarli correttamente.

## Protocollo: isolamento e purificazione di DNA genomico da campioni di sangue mediante utilizzo di un apparato da vuoto

Per isolare e purificare DNA genomico da campioni di 200 µl di sangue intero trattati con EDTA o citrato utilizzando un apparato da vuoto come QIAvac 24 Plus.

### Note importanti prima di iniziare

La seguente procedura fornisce istruzioni per elaborare un singolo campione di sangue. Tuttavia, l'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus permette di elaborare simultaneamente fino a 24 campioni.

### Operazioni da eseguire prima di iniziare

- Lasciar equilibrare i campioni di sangue a temperatura ambiente e assicurarsi che siano adeguatamente miscelati.
- Assicurarsi che tutti i reagenti e le colonne spin QIAamp Mini (in blister chiusi) siano equilibrati a temperatura ambiente.
- Impostare un blocco riscaldante a 56°C per prepararlo all'uso nel passaggio 4.
- Assicurarsi che il tampone di lavaggio 1 (AW1), il tampone di lavaggio 2 (AW2) e la QIAGEN Protease (QP) siano stati preparati secondo le istruzioni fornite nella sezione "Preparazione di reagenti e tamponi" a pagina 22.
- Se si è formato un precipitato nel tampone di lisi (AL), scioglierlo con un'incubazione a 56°C.
- Per limitare al minimo la contaminazione crociata, inserire un VacConnector (VC) in ciascun adattatore luer dell'apparato da vuoto.
- Assicurarsi che nell'apparato da vuoto il flacone di scarico sia vuoto e che tutti i raccordi siano collegati correttamente.
- Per ulteriori informazioni sul funzionamento dell'apparato da vuoto, in particolare sulla manutenzione, consultare il manuale fornito in dotazione con tale attrezzatura.
- Le procedure di controllo qualità di QIAGEN comprendono l'esecuzione di test funzionali per il rilascio dei kit condotti sui singoli lotti di kit. Pertanto, non miscelare reagenti appartenenti a lotti di kit diversi e non unire singoli reagenti provenienti da lotti di reagenti diversi.

## Procedura

1. Pipettare 20 µl di QIAGEN Protease (QP) in una provetta di lisi (LT).

**i** Prima dell'uso, controllare la data di scadenza della proteasi ricostituita.

2. Aggiungere 200 µl di sangue intero alla provetta di lisi (LT).

3. Aggiungere 200 µl di tampone di lisi (AL) alla provetta di lisi (LT), chiudere il tappo della provetta e miscelare il campione mediante utilizzo di un vortex a pulsazione per  $\geq 15$  secondi.

**i** Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone di lisi (AL), in modo da ottenere una soluzione omogenea.

**i** Poiché il tampone di lisi (AL) presenta un'elevata viscosità, assicurarsi di aggiungere il volume appropriato di tampone di lisi (AL) pipettando accuratamente o utilizzando una pipetta adeguata.

**i** Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).

4. Incubare a 56°C per 10 minuti.

5. Centrifugare la provetta di lisi (LT) per  $\geq 5$  s alla velocità massima per rimuovere le gocce all'interno del tappo.

6. Aggiungere 200 µl di etanolo (96–100%) alla provetta di lisi (LT), chiudere il tappo della provetta e miscelare il campione mediante utilizzo di un vortex a pulsazione per  $\geq 15$  s.

7. Centrifugare la provetta di lisi (LT) per  $\geq 5$  s alla velocità massima per rimuovere le gocce all'interno del tappo.

8. Inserire la colonna spin QIAamp Mini nel VacConnector (VC) sull'apparato da vuoto. Accertarsi che la valvola da vuoto principale (tra l'apparato da vuoto e il relativo collettore) e la valvola con tappo a vite (sul collettore da vuoto) siano chiuse. Azionare la pompa da vuoto.

Eliminare la provetta di lavaggio (WT) (2 ml) in cui viene collocata la colonna spin QIAamp Mini nel blister.

Il vuoto viene applicato soltanto al sistema di connessione (se utilizzato), anziché al collettore da vuoto.

9. Applicare con cura l'intero lisato del passaggio 7 alla colonna spin QIAamp Mini, senza bagnarne il bordo. Evitare di toccare la membrana della colonna spin QIAamp Mini con il puntale per pipetta.

**i** Se si elaborano vari campioni, aprire solo una provetta di lisi (LT) per volta.

10. Aprire la valvola da vuoto principale. Dopo avere estratto il lisato attraverso la colonna spin QIAamp Mini, chiudere la valvola da vuoto principale e aprire la valvola con tappo a vite sul collettore da vuoto per eseguire lo sfiato del collettore. Chiudere la valvola con tappo a vite dopo il rilascio del vuoto dal collettore.

Dopo avere chiuso la valvola da vuoto principale, il vuoto viene applicato soltanto al sistema di connessione (se utilizzato), anziché al collettore da vuoto.

**i** utilizzare la valvola con tappo a vite del collettore da vuoto per un rilascio rapido del vuoto.

**i** se si utilizzano più colonne spin QIAamp Mini simultaneamente, si consiglia di chiudere la VacValve di ogni colonna dopo il passaggio del lisato, in modo da limitare la durata di questa fase.

**i** se dopo 10 min il lisato non è ancora passato attraverso la membrana, posizionare la colonna spin QIAamp Mini in una provetta di lavaggio (WT) pulita, chiudere il tappo della provetta e centrifugare a circa 6000 x g (8000 rpm) per 3 min o finché il lisato non ha attraversato completamente la membrana. Posizionare la colonna spin QIAamp Mini in un'altra provetta di lavaggio (WT) pulita e continuare con il passaggio 10 del protocollo a pag. 33.

**i** se il lisato continua a non passare attraverso la membrana durante la centrifugazione, eliminare il campione e ripetere l'isolamento e la purificazione con nuovi campioni iniziando dal passaggio 1 a pag. 32.

11. Applicare 750 µl di tampone di lavaggio 1 (AW1) alla colonna spin QIAamp Mini, senza bagnarne il bordo. Evitare di toccare la membrana della colonna spin QIAamp Mini con il puntale per pipetta. Lasciare aperto il tappo della colonna e aprire la valvola da vuoto principale. Dopo avere estratto il tampone di lavaggio 1 (AW1) attraverso la colonna spin QIAamp Mini, chiudere la valvola da vuoto principale e aprire la valvola con tappo a vite per eseguire lo sfiato del collettore. Chiudere la valvola con tappo a vite dopo il rilascio del vuoto dal collettore.

12. Applicare 750 µl di tampone di lavaggio 2 (AW2) alla colonna spin QIAamp Mini, senza bagnarne il bordo. Evitare di toccare la membrana della colonna spin QIAamp Mini con il puntale per pipetta. Lasciare aperto il tappo della colonna e aprire la valvola da vuoto principale. Dopo avere estratto il tampone di lavaggio 2 (AW2) attraverso la colonna spin QIAamp Mini, chiudere la valvola da vuoto principale e aprire la valvola con tappo a vite per eseguire lo sfiato del collettore. Chiudere la valvola con tappo a vite dopo il rilascio del vuoto dal collettore.
13. Chiudere il tappo della colonna spin QIAamp Mini, rimuoverla dall'apparato da vuoto ed eliminare il VacConnector (VC). Posizionare la colonna spin QIAamp Mini in una provetta di lavaggio (WT) pulita e centrifugare alla velocità massima (circa a 20.000 x g o 14.000 rpm) per 3 minuti, in modo da asciugare la membrana completamente.
- ❗ se la membrana non viene asciugata per centrifugazione, potrebbe risultare impossibile eseguire l'esame downstream.
14. Posizionare la colonna spin QIAamp Mini in una provetta di eluizione (ET) pulita ed eliminare la provetta di lavaggio (WT) contenente il filtrato. Aprire con cura il tappo della colonna spin QIAamp Mini e applicare da 50 a 200 µl di tampone di eluizione (AE) al centro della membrana.
- ❗ È importante utilizzare una provetta di eluizione (ET) nuova per evitare la contaminazione con tamponi di lavaggio residui, che potrebbe causare l'inibizione dell'esame downstream.
  - ❗ Che il tampone di eluizione (AE) sia erogato al centro della membrana è importante soprattutto quando si tratta di volumi di eluizioni più piccoli, al fine di garantire un recupero ottimale degli acidi nucleici e del tampone di eluizione (AE).
15. Chiudere il tappo della provetta e incubare a temperatura ambiente per 1 minuto. Centrifugare a 6000 x g (8000 rpm) per 1 minuto, in modo da eluire il DNA.
- ❗ Orientare i coperchi delle provette di eluizione (ET) in modo che siano rivolti nel senso opposto alla rotazione del rotore (ad esempio, se il rotore ruota in senso orario, orientare i coperchi in senso antiorario).
  - ❗ Dopo l'esecuzione del protocollo, attenersi alla procedura di manutenzione dell'apparato da vuoto (per ulteriori informazioni, consultare il manuale in dotazione con tale attrezzatura).

## Controllo di qualità

In conformità al Sistema di gestione della qualità certificato da ISO di QIAGEN, ogni lotto di QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit viene testato rispetto a specifiche prestabilite, per garantire la costante qualità del prodotto.

## Limitazioni

Le prestazioni del sistema sono state determinate mediante l'uso di sangue intero per l'isolamento del DNA genomico.

Le informazioni sull'uso del QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit si trovano nella sezione "Descrizione e principio". I dettagli della procedura automatizzata si trovano nella sezione "Protocollo: isolamento e purificazione di DNA genomico da campioni di sangue mediante utilizzo di una microcentrifuga/purificazione automatizzata su QIAcube Connect MDx".

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni a valle. Per un'ulteriore convalida, si consiglia di attenersi alle linee guida della Conferenza Internazionale sull'Armonizzazione dei Requisiti Tecnici (ICH) riportate in ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Convalida dei metodi analitici: testo e metodologia).

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

## Caratteristiche delle prestazioni

Le caratteristiche delle prestazioni sono disponibili nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

# Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per maggiori informazioni, consultare anche la pagina relativa alle domande frequenti (FAQ) nel nostro servizio di assistenza tecnica: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Gli esperti dei Servizi tecnici QIAGEN sono sempre disponibili per rispondere a qualsiasi domanda riguardante informazioni e/o protocolli presentati in questo manuale o le tecnologie per campioni ed esami (per i dati di contatto visitare il sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Commenti e suggerimenti

---

### Manipolazione in generale

- a) Ostruzione dei puntali delle pipette durante il trasferimento dei campioni
- Miscelare bene i campioni di sangue (ad es. capovolgendo più volte le provette) prima di trasferire i campioni. I campioni congelati devono essere scongelati rapidamente in un bagno d'acqua a 37°C con una leggera agitazione per garantire un'accurata miscelazione e poi portati a temperatura ambiente (15–25°C) prima di iniziare la procedura.
- Cercare di evitare la formazione di coaguli di sangue nei campioni e trasferire il campione senza coaguli. I crioprecipitati che si formano durante lo scongelamento di campioni congelati ostruiscono la membrana della colonna spin QIAamp Mini e potrebbero causare problemi durante la procedura automatizzata.
- b) Colonna spin QIAamp Mini intasata
- Procedura di lavoro per la centrifugazione:
- se il lisato non è passato completamente attraverso la membrana dopo la centrifugazione a 6.000 × g (8.000 rpm), centrifugare di nuovo alla velocità massima (fino a 20.800 × g) per 1 minuto.
- Se il lisato continua a non passare attraverso la membrana durante la centrifugazione, eliminare il campione e ripetere l'isolamento e la purificazione con nuovi campioni iniziando dal passaggio 1.
- Procedura di lavoro sottovuoto:
- se la portata è ridotta, la durata del vuoto può essere prolungata.
- In alternativa, chiudere la VacValve, se la si utilizza, e rimuovere con attenzione il gruppo VacConnector-VacValve dalla colonna spin QIAamp Mini senza perdere il lisato.
- Rimuovere la colonna spin QIAamp Mini dal collettore da vuoto, posizionarla in una provetta di lavaggio da 2 ml e ruotarla a piena velocità fino a quando il campione non sia passato completamente attraverso la membrana. Riposizionare il gruppo VacConnector-VacValve che contiene il lisato rimanente. Accendere la pompa del vuoto, aprire la VacValve e continuare a caricare il lisato rimanente.

## Commenti e suggerimenti

Ripetere la procedura precedente, se la colonna spin QIAamp Mini continua a intasarsi.

Se il lisato continua a non passare attraverso la membrana durante la centrifugazione, eliminare il campione e ripetere l'isolamento e la purificazione con nuovi campioni iniziando dal passaggio 1.

### Informazioni generali

Nel plasma possono essersi formati crioprecipitati a causa di ripetuti congelamenti e scongelamenti. Questi possono bloccare la colonna spin QIAamp Mini. Non utilizzare campioni di sangue congelati e scongelati più di 3 volte. I campioni congelati devono essere scongelati rapidamente in un bagno d'acqua a 37°C con una leggera agitazione per garantire un'accurata miscelazione e poi portati a temperatura ambiente (15-25°C) prima di iniziare la procedura.

- c) Nel tampone di lisi (AL) si è formato del precipitato
- Dissolvere mediante incubazione del tampone di lisi (AL) a 56°C.
- d) Volumi di eluizione variabili
- Il volume dell'eluuto ottenuto dipende dalla natura del campione.
- A causa del tampone di eluizione (AE) rimanente trattenuta dalla membrana della colonna spin dopo la centrifugazione, il volume di eluito recuperato può essere inferiore al volume di tampone di eluizione applicato alla colonna.
- Applicare il tampone di eluizione (AE) al centro della membrana. Che il tampone di eluizione (AE) sia erogato al centro della membrana è importante soprattutto quando si tratta di volumi di eluizioni più piccoli, al fine di garantire un recupero ottimale degli acidi nucleici e del tampone di eluizione (AE).
- e) Pressione di vuoto di circa 800–900 mbar non raggiunta
- Il collettore da vuoto non è chiuso ermeticamente. Premere il coperchio del collettore da vuoto dopo l'attivazione del vuoto. Controllare se è stata raggiunta la pressione del vuoto. La guarnizione del coperchio del QIAvac è consumata. Controllare visivamente la tenuta del collettore e sostituirla se necessario.
- Le VacValves si sono consumate. Rimuovere tutte le VacValves e inserire i VacConnectors (VC) direttamente nelle estensioni luer. Inserire le colonne spin QIAamp Mini nei VacConnectors, chiudere i coperchi delle colonne e azionare il vuoto. Controllare se è stata raggiunta la pressione del vuoto. Sostituire le VacValves, se necessario.
- La connessione alla pompa del vuoto non è a tenuta stagna. Chiudere tutte le estensioni luer con tappi luer e azionare la pompa del vuoto. Controllare se la pressione del vuoto è stabile dopo l'azionamento della pompa (e la valvola del Vacuum Regulator è chiusa). Sostituire le connessioni tra pompa e collettore da vuoto, se necessario.
- Se la pressione del vuoto non viene ancora raggiunta, sostituire la pompa da vuoto con una più forte.
- f) Se si riscontrano problemi nella procedura di lavoro automatizzata:
- Fare riferimento al *Manuale utente di QIAcube Connect MDx* (disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

**Bassa resa del DNA**

- a) Lisi dei campioni incompleta
- Se la QIAGEN Protease (QP) è stata sottoposta a temperature elevate per un tempo prolungato, può ridurre la sua capacità d'azione. Ripetere la procedura utilizzando nuovi campioni e QIAGEN Protease (QP) fresca.
- Assicurarsi di dissolvere la QIAGEN Protease (QP) con solvente della proteasi (PS) attenendosi alle istruzioni fornite in precedenza. Per evitare la formazione di schiuma, miscelare capovolgendo la fiala diverse volte. Assicurarsi che la QIAGEN Protease (QP) sia completamente disciolta. Non aggiungere la QIAGEN Protease (QP) direttamente al tampone di lisi (AL).
- Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il tampone di lisi (AL), in modo da ottenere una soluzione omogenea. Poiché il tampone di lisi (AL) presenta un'elevata viscosità, assicurarsi di aggiungere il volume appropriato di tampone di lisi (AL) pipettando accuratamente o utilizzando una pipetta adeguata.
- b) Bassa percentuale di etanolo utilizzata invece del 96-100%
- Ripetere la procedura di purificazione con nuovi campioni e il 96-100% di etanolo. Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone.
- c) Buffer AW1 o Buffer AW2 preparato in modo errato
- Assicurarsi che i concentrati di Buffer AW1 e Buffer AW2 siano stati diluiti con il volume corretto, 96-100%, di etanolo e miscelati capovolgendo più volte il flacone prima di iniziare la procedura.
- d) I campioni di sangue non sono stati conservati correttamente
- La resa e la qualità del DNA purificato dipendono dalle condizioni di conservazione del sangue. I campioni di sangue più freschi possono produrre risultati migliori. Per una conservazione a breve termine (fino a 10 giorni), si raccomanda di conservare le provette a 2-8°C. Tuttavia, per le applicazioni che richiedono le dimensioni massime di frammento, quali il Southern blotting, si consiglia una conservazione a 2-8°C per massimo 3 giorni, in quanto dopo questo periodo si registrano bassi livelli di degradazione del DNA. Per una conservazione a lungo termine (oltre 10 giorni), occorre raccogliere il sangue in provette contenenti un anticoagulante standard (preferibilmente EDTA, se è richiesto DNA ad elevato peso molecolare) e conservare le provette a -20 o -80°C.
- e) Campioni di sangue congelati non miscelati correttamente dopo lo scongelamento
- I campioni congelati devono essere scongelati rapidamente in un bagno d'acqua a 37°C con una leggera agitazione per garantire un'accurata miscelazione e poi portati a temperatura ambiente (15-25°C) prima di iniziare la procedura.

---

**Prestazioni non sufficienti del DNA nelle reazioni downstream**

- a) DNA scarso o assente nell'eluito
- Per i possibili motivi, vedere "Resa del DNA bassa" in precedenza. Aumentare la quantità di eluito aggiunto alla reazione, se possibile.

### Commenti e suggerimenti

---

- |    |   |  |
|----|---|--|
| b) | Volume di eluizione inadeguato utilizzato | Stabilire il massimo volume di eluito adatto per la vostra applicazione a valle. Ridurre o aumentare di conseguenza il volume di eluito aggiunto all'applicazione a valle. Il volume di eluizione può essere adattato in proporzione. Un'eluizione con volumi inferiori di Buffer AE porta a maggiori concentrazioni di acido nucleico, ma può tradursi in una minore resa totale. |
| c) | DNA utilizzato insufficiente              | Quantificare il DNA purificato usando uno spettrofotometro per determinare l'assorbanza a 260 nm.  |
| d) | DNA utilizzato in eccesso                 | L'eccesso di DNA può inibire alcune reazioni enzimatiche. Quantificare il DNA purificato usando uno spettrofotometro per determinare l'assorbanza a 260 nm.  |
| e) | Potenziale carryover di inibitore         | Assicurarsi di eseguire il passaggio di centrifugazione a secco prima dell'eluizione, al fine di prevenire una potenziale inibizione dell'esame downstream. È importante utilizzare una provetta di eluizione (ET) nuova per evitare la contaminazione con tamponi di lavaggio residui, che potrebbe causare l'inibizione dell'esame downstream.                                   |

# Simboli

I seguenti simboli compaiono nelle istruzioni per l'uso o su confezioni ed etichette:

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto di reagenti sufficiente per <N> reazioni
	Data di scadenza
	Questo prodotto soddisfa i requisiti del Regolamento europeo 2017/746 per i dispositivi medico-diagnostici in vitro.
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Al momento della consegna
	Aprire alla consegna; conservare le colonne spin QIAamp Mini a 2–8°C
	Numero di catalogo
	Numero di lotto
	Numero di materiale (vale a dire, l'etichetta del componente)
	Componenti
	Contenuto

Simbolo	Definizione del simbolo
	Numero
	Codice GTIN
Rn	R sta per revisione delle istruzioni per l'uso e n è il numero di revisione
	Limite di temperatura
	Produttore
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Volume
	Annotare la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone
	Aggiunta
	Liofilizzato
	Ricostituito in
	Etanolo

## Simbolo

## Definizione del simbolo

	Guanidina cloridrato
	Subtilisina
	Porta a
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Nota importante
	Identificatore univoco del dispositivo

## Informazioni per gli ordini

Prodotto	Indice	N. cat.
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	Per 50 preparazioni: colonne spin QIAamp Min, tamponi, reagenti, provette, VacConnectors	61104
Prodotti correlati		
QIAcube Connect MDx*	Strumento e garanzia di 1 anno sulle parti e sulla funzionalità di laboratorio	9003070
Accessori		
QIAvac 24 Plus†	Collettore da vuoto per processare 1–24 colonne spin: comprende QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, Luer Plugs, Quick Couplings	19413
Vacuum Pump (230 V, 50 Hz)†	Pompa per vuoto universale (capacità 34 litri/min, 8 mbar vuoto ass.)	84020
VacConnectors (500)†	500 connettori monouso da utilizzare con colonne spin QIAamp su connettori luer	19407
VacValves (24)	24 valvole per l'uso con QIAvac 24 e QIAvac 24 Plus	19408
Vacuum Regulator	Per l'uso con collettori QIAvac	19530
QIAvac Connecting System	Sistema per collegare il collettore da vuoto con la pompa del vuoto: include vassoio, flaconi per rifiuti, tubi, raccordi, valvole, manometri, 24 VacValves	19419

<b>Prodotto</b>	<b>Indice</b>	<b>N. cat.</b>
Rotor Adapters (10 x 24)	Per 240 preparazioni: 240 adattatori per rotore monouso e 240 provette di eluizione (1,5 ml); per uso con QIAcube Connect MDx	990394
Rotor Adapter Holder	Supporto per 12 adattatori per rotore monouso, per uso con QIAcube Connect MDx	990392
Sample Tubes CB (2 ml)	1000 provette a fondo conico con tappo a vite senza base (2 ml) per uso con il QIAcube Connect MDx	990382
Shaker Rack Plugs	Innesti per rack agitatore (12)	9017854
Reagent Bottles, 30 ml (6)	Flaconi per reagenti (30 ml) con tappi; confezione da 6; per uso con QIAcube Connect MDx	990393
Filter-Tips, 1000 µl (1024)	Puntali con filtro monouso, su rack; (8 x 128). Per uso con QIAcube Connect MDx	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore (1024)	Puntali con filtro monouso, foro largo, in rack; (8 x 128); non necessari per tutti i protocolli. Per uso con QIAcube Connect MDx	990452
Filter-Tips, 200 µl (1024)	Puntali con filtro monouso, su rack; (8 x 128). Da utilizzare con gli strumenti QIAcube Connect MDx e QIASymphony SP/AS	990332

\* QIAcube Connect MDx non è disponibile in tutti i paesi. Per ulteriori dettagli, contattare i servizi tecnici QIAGEN.

† Da utilizzare con i protocolli per il vuoto.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare le Istruzioni per l'uso del rispettivo kit QIAGEN. Le Istruzioni per l'uso dei kit QIAGEN sono disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) oppure possono essere richieste ai servizi tecnici QIAGEN o al distributore locale.

# Cronologia delle revisioni del documento

Revisione	Descrizione
R1, giugno 2022	<p>Versione 3, revisione 1</p> <ul style="list-style-type: none"><li>● Aggiornamento al kit versione 3 per conformità con IVDR</li><li>● Aggiornamento di descrizione e principio</li><li>● Aggiornamento di Materiali in dotazioni (aggiunta di principi attivi) e Materiale necessario ma non in dotazione</li><li>● Aggiornamento di Avvertenze e precauzioni (aggiunta di informazioni di emergenza e sezione sullo smaltimento)</li><li>● Aggiornamento di Conservazione e manipolazione dei reagenti</li><li>● Aggiornamento di Raccolta, conservazione e manipolazione dei campioni</li><li>● Aggiornamento di Note importanti e procedura</li><li>● Aggiornamento di Limitazioni</li><li>● Aggiornamento di Caratteristiche delle prestazioni</li><li>● Aggiornamento della sezione Simboli</li><li>● Aggiornamento delle Informazioni per gli ordini</li></ul>

Pagina lasciata vuota intenzionalmente

#### Contratto di Licenza Limitato per QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit

L'uso di questo prodotto implica l'accordo di qualsiasi acquirente o utente del prodotto ai seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al presente manuale e soltanto con i componenti contenuti nel pannello. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo pannello con qualsiasi componente non incluso in questo pannello, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. Al di fuori delle licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non garantisce che questo pannello e/o il suo utilizzo non violino i diritti di terzi.
3. Questo pannello e i relativi componenti sono concessi in licenza per un unico uso e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del pannello accettano di non prendere o permettere a chiunque altro di prendere misure che potrebbero portare o facilitare qualsiasi atto vietato sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo pannello e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, vedere [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube® (QIAGEN Group); Sarstedt® (Sarstedt AG and Co. KG).

Jun-2022 HB-3030-001 1127543IT © 2022 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

