

Febrero 2017

Hoja de protocolo del instrumento QIAasympphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V1 y
circDNA_4000_DSP_V1

Este documento es Hoja de protocolo del instrumento QIAasympphony circDNA_2000_DSP_V1 y
circDNA_4000_DSP_V1, versión 1, R1

Información general

Para uso diagnóstico *in vitro*

Este protocolo está indicado para la purificación de ADN circulante libre humano a partir de plasma y orina humanos frescos o congelados utilizando el instrumento QIAasymphony SP y el kit QIAasymphony DSP Circulating DNA.

Kit	QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (n.º de catálogo 937556)
Material de muestra	Plasma humano: anticoagulado con EDTA o citrato, o con ccfDNA estabilizado Orina humana: no estabilizada o estabilizada
Nombre del protocolo	circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1
Conjunto de controles de ensayo predeterminado	ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1
Volumen de elución	60 µl
Versión del software requerida	Versión 4.0.3 o superior

Cajón "Sample" (Muestras)

Tipo de muestra	Plasma humano (consulte "Preparation of sample material") y orina humana (estabilizada o no estabilizada)
Volumen de muestra	Depende del tipo de tubo de muestras usado Para más información, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com .
Tubos de muestra primarios	n/a
Tubos de muestra secundarios	Si desea obtener más información, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com .
Insertos	n/a
Otro	La proteína K se debe añadir en la ranura A (posición 1 o 2)

n/a = no aplicable.

Preparación de la proteinasa K en el cajón "Sample"

El kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA contienen solución de proteinasa K lista para usar que puede conservarse a temperatura ambiente.

Nota: Se colocan tubos que contienen proteinasa K en un portatubos. Los tubos que contiene la proteinasa K debe colocarse en las posiciones 1 o 2 en la ranura A del cajón "Sample". Consulte el tipo de tubo necesario en la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com.

Número de muestras*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1.980 µl	2.860 µl
24	3.740 µl	6.380 µl
48	6.380 µl	11.660 ml†
96	11.660 ml	22.220 ml†

* Para cada muestra se requieren 110 µl para circDNA_2000_DSP o 220 µl para circDNA_4000_DSP, más un volumen vacío adicional de 1.100 µl [(n x 110 o 220 µl) + 1.100 µl].

† Para circDNA_4000_DSP: Si se procesan más de 48 muestras, utilice un segundo tubo. El volumen de carga máximo de cada tubo es de 11.660 µl. Para el segundo tubo se requiere un volumen vacío adicional de 1.100 µl.

Cajón "Reagents and Consumables" (Reactivos y consumibles)

Posición A1 y/o A2	Cartucho de reactivos
Posición B1	n/a
Soporte de gradillas de puntas 1-18	Puntas con filtro desechables, 200 µl o 1.500 µl
Soporte de caja unitaria 1-4	Cajas unitarias que contienen cartuchos de preparación de muestras o cubiertas para 8 barras

n/a = no aplicable.

Cajón "Waste" (Desechos)

Soporte de caja unitaria 1-4	Cajas unitarias vacías
Soporte de bolsa de desechos	Bolsa de desechos
Soporte para frasco de desechos líquidos	Frasco de desechos líquidos vacío

Cajón "Eluate" (Eluidos)

Gradilla de elución (se recomienda utilizar la ranura 1, posición de refrigeración)

Si desea obtener más información, consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com.

Materiales plásticos necesarios

Protocolo circDNA_2000_DSP

Material de plástico	Un lote 24 muestras*	Dos lotes 48 muestras*	Cuatro lotes 96 muestras*
Puntas con filtro desechables, 200 µl†	24	48	96
Puntas con filtro desechables, 1.500 µl†	64	120	232
Cartuchos de preparación de muestras§	15	30	60
Cubiertas para 8 barras¶	3	6	12

* Si se utilizan menos de 24 muestras por lote se reduce el número de puntas con filtro desechables necesarias por serie analítica.

† Hay 32 puntas con filtro por gradilla de puntas de filtro.

‡ El número de puntas con filtro necesarias incluye las puntas con filtro para 1 examen de inventario por cartucho de reactivos.

§ Hay 28 cartuchos de preparación de muestras por caja unitaria.

¶ Hay doce cubiertas para 8 barras por caja unitaria.

Protocolo circDNA_4000_DSP

Material de plástico	Un lote 24 muestras*	Dos lotes 48 muestras*	Cuatro lotes 96 muestras*
Puntas con filtro desechables, 200 µl†	24	48	96
Puntas con filtro desechables, 1.500 µl†	104	200	392
Cartuchos de preparación de muestras§	18	36	72
Cubiertas para 8 barras¶	3	6	12

* Si se utilizan menos de 24 muestras por lote se reduce el número de puntas con filtro desechables necesarias por serie analítica.

† Hay 32 puntas con filtro por gradilla de puntas de filtro.

‡ El número de puntas con filtro necesarias incluye las puntas con filtro para 1 examen de inventario por cartucho de reactivos.

§ Hay 28 cartuchos de preparación de muestras por caja unitaria.

¶ Hay doce cubiertas para 8 barras por caja unitaria.

Nota: Los números de puntas con filtro proporcionados pueden diferir de los números mostrados en la pantalla táctil dependiendo de la configuración. Se recomienda cargar el número máximo posible de puntas.

Volumen de elución

Volumen de elución seleccionado	Volumen de elución inicial
60 µl	75 µl

El volumen de elución se selecciona en la pantalla táctil. El volumen de elución medio disponible es de ≥60 µl. En casos individuales, el volumen de eluido final para determinadas muestras puede ser hasta 5 µl menor que el volumen seleccionado (p. ej., 55 µl). Se recomienda comprobar el volumen de eluido real cuando se utilice un sistema de preparación automatizada del ensayo que no verifique el volumen de eluido antes de la transferencia.

Conservación de los eluidos

Se recomienda retirar la placa de eluidos del cajón "Eluate" nada más finalizar la serie. Las placas de elución se pueden dejar en el instrumento QIA Symphony SP una vez haya finalizado la serie durante la noche (como máximo 16 horas, incluido el tiempo de la serie; condiciones ambientales recomendadas:

18–26 °C y 20–75 % de humedad relativa). Dependiendo de la temperatura y de la humedad, el eluido puede experimentar condensación o evaporación.

Después de la preparación de la muestra, los eluidos pueden conservarse a 2–8 °C hasta 1 mes. Para la conservación a largo plazo, los eluidos pueden conservarse a –20 °C o a –80 °C. Los eluidos congelados no deben descongelarse más de 3 veces.

Preparación del material de muestra

Cuando trabaje con productos químicos, use siempre una bata de laboratorio adecuada, guantes desechables y gafas de protección. Si desea obtener más información, consulte las fichas de datos de seguridad (SDS) correspondientes que el proveedor del producto pone a su disposición.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Evite la formación de espuma en el interior o en la superficie de las muestras.
- Las muestras deben equilibrarse a temperatura ambiente (15–25 °C) antes de comenzar el ciclo.

Plasma humano

Para la obtención de plasma, se pueden utilizar muestras de sangre con EDTA o citrato como anticoagulante. También se puede utilizar plasma preparado a partir de tubos de recogida de sangre estabilizadores de ccfDNA. El plasma se obtiene de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Si se utiliza EDTA o citrato como anticoagulante, se recomienda separar el plasma inmediatamente después de la extracción de la sangre.

Para determinadas aplicaciones posteriores puede ser necesario excluir o minimizar los ácidos nucleicos procedentes de vesículas. En estos casos, se recomienda intercalar un paso de centrifugado de alta velocidad a 16.000 x *g* durante 10 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C) después de la obtención inicial del plasma.

Una vez extraído y centrifugado, el plasma puede conservarse a temperatura ambiente hasta 7 días y a 2–8 °C hasta un máximo de 14 días. Para una conservación más larga, se recomienda congelar las alícuotas a –20 °C o a –80 °C. El plasma congelado no debe descongelarse más de 3 veces. La congelación y descongelación repetidas desnaturaliza y precipita las proteínas, lo que puede provocar una disminución de la cantidad de ácidos nucleicos circulantes libres. Si en las muestras se aprecian crioprecipitados, centrifugue a 6.800 x *g* durante 3 minutos a temperatura

ambiente (15–25 °C) y transfiera los sobrenadantes a un tubo de muestras secundario sin alterar los precipitados (consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com). Inicie inmediatamente el procedimiento de purificación.

Orina humana

Debido a la degradación rápida del ADN circulante libre después de la recolección de la orina, se recomienda enfáticamente estabilizar las muestras de orina sin demora.

Orina humana estabilizada

La orina estabilizada se puede conservar a temperatura ambiente (15–25 °C) o a 2–8 °C durante un máximo de 7 días. Para una conservación más larga, se recomienda congelar las alícuotas a –20 °C o a –80 °C.

Las muestras de orina estabilizadas no requieren ningún pretratamiento. Tras la estabilización, se recomienda centrifugar las muestras de orina a baja velocidad (1.900 x g) durante 10 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C) para eliminar las células antes de proceder a la extracción del ADN circulante libre. Se después del centrifugado se aprecian precipitados en los sobrenadantes, caliente las muestras a 25 °C en un baño María para disolverlos. Antes de comenzar una serie, transfiera las muestras de orina estabilizadas a un tubo de muestras secundario y después cargue este tubo en el soporte para muestras (consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com).

Orina humana “no estabilizada”

Antes de comenzar un protocolo que requiera el uso del tampón ATL, compruebe si se ha formado precipitado en el tampón ATL. En caso necesario, disuélvalo calentando el tampón en un baño María a 70 °C agitando suavemente. Aspire las burbujas presentes en la superficie del tampón ATL.

Nota: El tampón ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, n.º de catálogo 939016) no forma parte del kit QIAAsymphony DSP Circulating DNA y se debe pedir por separado.

Se recomienda centrifugar las muestras de orina inmediatamente después de la recolección a baja velocidad (1.900 x g) durante 10 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C) para eliminar las células. Las muestras de orina no estabilizadas requieren un pretratamiento.

Importante: Antes de iniciar el pretratamiento, deje que las muestras se equilibren a temperatura ambiente (15–25 °C).

Importante: El centrifugado y el pretratamiento deben realizarse en las 4 horas siguientes a la recolección de la orina.

- Mezcle 2.500 µl de orina (circDNA_2000_DSP) o 4.500 µl de orina (circDNA_4000_DSP) con 250 µl o 450 µl de tampón ATL, respectivamente.
- Incube las muestras a temperatura ambiente (15–25 °C) durante 1 hora.
- Centrifugue las muestras a 1.900 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente (15–25 °C).

Se después del centrifugado se aprecian precipitados en el sobrenadante, caliente las muestras a 25 °C en un baño María para disolverlos.

- Transfiera los sobrenadantes a un tubo de muestras secundario y después cargue este tubo en el soporte para muestras (consulte la lista de materiales de laboratorio que encontrará en la pestaña de recursos de la página de productos en www.qiagen.com).

Importante: La estabilidad e integridad del ADN circulante libre están limitadas en muestras de orina no estabilizadas. Se recomienda cargar como máximo un lote de 24 muestras para cada serie de QIAAsymphony a fin de minimizar el tiempo de permanencia en el instrumento de las muestras de orina.

Sustancias causantes de interferencias

Las muestras de plasma con altas concentraciones de gammaglobulina (>30 g/l) pueden reducir la recuperación del ADN circulante libre.

Si desea obtener información actualizada sobre la licencia y las exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o el manual del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse al Servicio Técnico de QIAGEN o al distribuidor local.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAAsymphony® (QIAGEN Group). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales.
02/2017 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, reservados todos los derechos.

