

Febbraio 2017

Scheda del protocollo QIAasympphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V1 e
circDNA_4000_DSP_V1

Il presente documento è la Scheda del Protocollo QIAasympphony circDNA_2000_DSP_V1 e
circDNA_4000_DSP_V1, versione 1, R1

Informazioni generali

Per uso diagnostico in vitro.

Questo protocollo è previsto per la purificazione del DNA libero circolante da plasma e urina umani freschi o congelati utilizzando il QIAasymphony SP e il kit QIAasymphony DSP Circulating DNA.

Kit	QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (cat. n. 937556)
Campioni	Plasma umano: trattato con anticoagulante EDTA o citrato o ccfDNA stabilizzato Urina umana: stabilizzata o non stabilizzata
Nome del protocollo	circDNA_2000_DSP_V1 circDNA_4000_DSP_V1
Set di controllo del test predefinito	ACS_circDNA_2000_DSP_V1 ACS_circDNA_4000_DSP_V1
Volume di eluizione	60 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0.3 o superiore

Cassetto "Sample" (Campione)

Tipo di campione	Plasma umano (vedere "Preparation of sample material") e Urina umana (stabilizzata o non stabilizzata)
Volume del campione	A seconda del tipo di provetta per campioni utilizzata Per maggiori informazioni, consultare l'elenco della plasticheria disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com .
Provette per campioni primarie	n/a
Provette per campioni secondarie	Per maggiori informazioni, consultare l'elenco della plasticheria disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com .
Inserti	n/a
Altro	La proteinasi K deve essere aggiunta nello slot A (posizione 1 e/o 2)

n/a = non applicabile.

Preparazione della proteinasi K nel cassetto "Sample"

Il kit QIAasympyphony DSP Circulating DNA contiene soluzione di proteinasi K pronta per l'uso, che può essere conservata a temperatura ambiente.

Nota: Le provette contenenti proteinasi K vengono collocate in un portaprovette. La o le provette contenenti la proteinasi K devono essere collocate nelle posizioni 1 e/o 2 nello slot A del cassetto "Sample". Per il tipo di provetta necessario, consultare l'elenco della plastiche disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com.

Numero dei campioni*	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†

* Per ogni campione sono necessari 110 µl per circDNA_2000_DSP o 220 µl per circDNA_4000_DSP, più un ulteriore volume vuoto di 1.100 µl [(n x 110 o 220 µl) + 1.100 µl].

† Per circDNA_4000_DSP: Se devono essere processati più di 48 campioni, utilizzare una seconda provetta. Il volume massimo di caricamento per provetta è di 11.660 µl. Per la seconda provetta è necessario un volume vuoto supplementare di 1.100 µl.

Cassetto "Reagents and Consumables" (Reagenti e materiali di consumo)

Posizione A1 e/o A2	Cartuccia reagenti
Posizione B1	n/a
Supporto per rack per puntali 1-18	Puntali con filtro monouso, 200 µl o 1500 µl
Supporto per box unitari 1-4	Box unitari contenenti cartucce per la preparazione dei campioni o coperchi per 8 barre

n/a = non applicabile.

Cassetto "Waste" (Materiali di scarto)

Supporto per box unitari 1-4	Box unitari vuoti
Supporto per sacchetto dei materiali di scarto	Sacchetto dei materiali di scarto
Supporto per contenitore dei residui liquidi	Contenitore dei residui liquidi vuoto

Cassetto "Eluate" (Eluati)

Rack per eluizione (si raccomanda di utilizzare lo slot 1, posizione di raffreddamento)

Per maggiori informazioni, consultare l'elenco della plasticheria disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com.

Plastica da laboratorio occorrente

Protocollo circDNA_2000_DSP

Plastica da laboratorio	Un lotto 24 campioni*	Due lotti 48 campioni*	Quattro lotti 96 campioni*
Puntali con filtro monouso, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Puntali con filtro monouso, 1.500 µl ^{†‡}	64	120	232
Cartucce per la preparazione dei campioni [§]	15	30	60
Coperchi per 8 barre [¶]	3	6	12

* L'impiego di meno di 24 campioni per lotto riduce il numero di puntali con filtro monouso necessari per ogni processo.

† Ci sono 32 puntali con filtro in ogni rack corrispondente.

‡ La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

§ Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

¶ Ci sono dodici coperchi per 8 barre in ogni box unitario.

Protocollo circDNA_4000_DSP

Plastica da laboratorio	Un lotto 24 campioni*	Due lotti 48 campioni*	Quattro lotti 96 campioni*
Puntali con filtro monouso, 200 µl ^{†‡}	24	48	96
Puntali con filtro monouso, 1.500 µl ^{†‡}	104	200	392
Cartucce per la preparazione dei campioni [§]	18	36	72
Coperchi per 8 barre [¶]	3	6	12

* L'impiego di meno di 24 campioni per lotto riduce il numero di puntali con filtro monouso necessari per ogni processo.

† Ci sono 32 puntali con filtro in ogni rack corrispondente.

‡ La quantità di puntali con filtro necessari include i puntali con filtro per 1 scansione di inventario per ogni cartuccia reagenti.

§ Ci sono 28 cartucce per la preparazione dei campioni in ogni box unitario.

¶ Ci sono dodici coperchi per 8 barre in ogni box unitario.

Nota: Le quantità indicate per i puntali con filtro possono variare da quelle visualizzate sul touch screen a seconda delle impostazioni. Si raccomanda di caricare la massima quantità possibile di puntali.

Volume di eluizione

Volume di eluizione selezionato	Volume di eluizione iniziale
60 µl	75 µl

Il volume di eluizione viene selezionato sul touch screen. Il volume di eluizione medio disponibile è ≥60 µl. In singoli casi, il volume di eluato finale per i singoli campioni potrebbe essere inferiore anche di 5 µl rispetto al volume selezionato (ad es., 55 µl). Si consiglia di controllare l'effettivo volume di eluato quando si utilizza un sistema automatizzato di setup del test che non verifica il volume di eluato prima del trasferimento.

Conservazione degli eluati

Si consiglia di rimuovere la piastra per eluizione dal cassetto "Eluate" subito dopo il termine del processo. Le piastre per eluizione possono essere lasciate nel QIA Symphony SP al termine del processo il giorno seguente (massimo 16 ore, inclusa la durata del processo stesso; condizioni ambientali raccomandate:

18–26°C e umidità relativa del 20–75%). In base alla temperatura e al grado di umidità, l'eluato potrebbe essere esposto a formazione di condensa o evaporazione.

Dopo la preparazione dei campioni, è possibile conservare gli eluati a 2–8°C fino a 1 mese. Per la conservazione a lungo termine, gli eluati possono essere conservati a –20°C o a –80°C. Gli eluati congelati non devono essere scongelati più di 3 volte.

Preparazione dei campioni

Quando si opera con sostanze chimiche, indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le rispettive schede tecniche di sicurezza (SDS), reperibili presso il fornitore.

Accorgimenti importanti prima di iniziare

- Evitare la formazione di schiuma all'interno o sui campioni.
- I campioni devono essere termostatati a temperatura ambiente (15–25°C) prima di avviare la procedura.

Plasma umano

È possibile utilizzare campioni di sangue trattati con EDTA oppure citrato come anticoagulante per la preparazione del plasma. Si può utilizzare anche plasma preparato per provette di prelievo ematico per stabilizzazione del ccfDNA. Il plasma viene generato come specificato dal produttore.

Se si utilizza EDTA o citrato come anticoagulante, si raccomanda di eseguire la separazione del plasma subito dopo la donazione di sangue.

Per determinate applicazioni a valle potrebbe essere necessario escludere o ridurre al minimo gli acidi nucleici dalle vescicole. In tali casi, si consiglia di eseguire una fase di centrifugazione ad alta velocità a 16.000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente (15–25°C) dopo la generazione di plasma iniziale.

Dopo il prelievo e la centrifugazione, il plasma può essere conservato a temperatura ambiente fino a 7 giorni oppure a 2–8°C fino a 14 giorni. Per intervalli di conservazione più lunghi si consiglia di congelare le aliquote a –20°C o –80°C. Il plasma congelato non deve essere scongelato più di 3 volte. Il congelamento–decongelamento ripetuto causa la denaturazione e la precipitazione delle proteine, con la conseguente riduzione delle rese degli acidi nucleici liberi circolanti. Se nei campioni sono visibili dei crioprecipitati, centrifugare a 6.800 x g per 3 minuti a temperatura ambiente, (15–25°C) e trasferire i supernatanti a una provetta per campioni secondaria senza

disturbare i pellet (vedere l'elenco della plasticheria disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com). Avviare immediatamente il processo di purificazione.

Urina umana

A causa della rapida degradazione del DNA libero circolante dopo la raccolta di urina, si raccomanda vivamente di stabilizzare subito i campioni.

Urina umana stabilizzata

L'urina stabilizzata può essere conservata a temperatura ambiente (15–25°C) o a 2–8°C fino a 7 giorni. Per intervalli di conservazione più lunghi si consiglia di congelare le aliquote a –20°C o –80°C.

I campioni di urina stabilizzata non richiedono nessun pretrattamento. Dopo la stabilizzazione, si consiglia di centrifugare i campioni di urina ad alta velocità (1.900 x g) per 10 minuti a temperatura ambiente (15–25°C) per eliminare le cellule prima dell'estrazione del DNA libero circolante. Se dopo la centrifugazione nei supernatanti sono visibili precipitati, riscaldare i campioni a 25°C in un bagno d'acqua per dissolverli. Prima di avviare un processo, trasferire i campioni di urina stabilizzati in una provetta per campioni secondaria, quindi caricare la provetta sul portacampioni (vedere l'elenco della plasticheria disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com).

Urina umana "non stabilizzata"

Prima di avviare un protocollo che richiede il tampone ATL, controllare se si è formato del precipitato nel tampone ATL. Se necessario, scioglierlo riscaldando il tampone a 70°C e agitolandolo delicatamente in un bagno d'acqua. Aspirare le bolle d'aria dalla superficie del tampone ATL.

Nota: Il tampone ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, cat. n. 939016) non è incluso nel kit medio QIAAsymphony DSP Circulating DNA e deve essere ordinato separatamente.

Si consiglia di centrifugare i campioni di urina subito dopo il prelievo ad alta velocità (1.900 x g) per 10 minuti a temperatura ambiente (15–25°C) per eliminare le cellule. I campioni di urina non stabilizzata richiedono un pretrattamento.

Importante: Termostatare i campioni a temperatura ambiente (15–25°C) prima di iniziare il pretrattamento.

Importante: La centrifugazione e il pretrattamento dei campioni di urina devono essere eseguiti entro 4 ore dal prelievo.

- Miscelare 2.500 µl di urina (circDNA_2000_DSP) o 4.500 µl di urina (circDNA_4000_DSP) rispettivamente con 250 µl o 450 µl di tampone ATL.
- Incubare i campioni a temperatura ambiente (15–25°C) per 1 ora.
- Centrifugare i campioni a 1.900 x g per 10 minuti a temperatura ambiente (15–25°C).
Se dopo la centrifugazione nel supernatante sono visibili precipitati, riscaldare i campioni a 25°C in un bagno d'acqua per dissolverli.
- Trasferire i supernatanti in una provetta per campioni secondaria, quindi caricare la provetta sul portacampioni (vedere l'elenco della plastiche disponibile nella scheda delle risorse della pagina prodotti all'indirizzo www.qiagen.com).

Importante: Nell'urina non stabilizzata, la stabilità e l'integrità del DNA libero circolante sono limitate. Si consiglia di caricare al massimo un lotto di 24 campioni per ogni processo eseguito su QIASymphony per ridurre al minimo il tempo a bordo dei campioni di urina.

Sostanze interferenti

I campioni di plasma con concentrazioni elevate di gamma-globulina (>30 g/l) potrebbero causare una riduzione del recupero di DNA libero circolante.

Per informazioni aggiornate sulla licenza e per i disclaimer specifici dei prodotti consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili nel sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di QIAGEN Technical Services o al proprio distributore locale.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Gruppo QIAGEN). I marchi, i nomi registrati ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge.
02/2017 HB-2309-S01-001
© 2017 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

