

# Instruções de uso (Ficha de protocolo) do QIASymphony<sup>®</sup> DSP DNA Mini Kit

Protocolos Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP e Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro

Para uso com o QIASymphony DSP DNA Mini Kit (192)



937236



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha

R1

A ficha de protocolo está disponível eletronicamente e pode ser encontrada na guia de recursos da página de produto em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Informações gerais

O QIAasymphony DSP DNA Kit destina-se ao uso diagnóstico in vitro.

Estes protocolos destinam-se à purificação do DNA total de tecidos e tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) usando o QIAasymphony SP e o QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.

Dependendo do tipo de amostra, recomendamos o uso do protocolo de baixo conteúdo (low content, LC) ou alto conteúdo (high content, HC). Os tecidos fornecerão maiores rendimentos de DNA quando processados com o protocolo de alto conteúdo, mas o protocolo de baixo conteúdo, em conjunto com um pequeno volume de eluição (50 µl), pode ser usado se for necessária uma alta concentração de DNA. Para tecido FFPE, recomendamos o uso do protocolo de baixo conteúdo.

### Protocolo de baixo conteúdo

<b>Kit</b>	QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (Ref. 937236)
<b>Material de amostra</b>	Tecido e tecido FFPE * Até 4 seções de tecido FFPE, cada uma com uma espessura de até 10 µm, ou 8 seções, com uma espessura de até 5 µm e uma área de superfície de até 250 mm <sup>2</sup> , podem ser combinadas em uma preparação.
<b>Nome do protocolo</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Conjunto de controle de ensaio padrão</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Volume de eluição</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl ou 400 µl
<b>Versão de software necessária</b>	Versão 4.0 ou superior
<b>Configuração de software necessária para uso em diagnóstico in vitro</b>	Perfil padrão 1

\* Veja o protocolo de alto conteúdo para obter informações sobre amostras de tecido.

### Protocolo de alto conteúdo

<b>Kit</b>	QIAasymphony DSP DNA Mini Kit (Ref. 937236)
<b>Material de amostra</b>	Tecido Se as informações sobre o rendimento esperado não estiverem disponíveis, recomendamos começar com 25 mg de material de amostra. Dependendo do rendimento obtido, o tamanho da amostra pode ser aumentado em preparações subsequentes.
<b>Nome do protocolo</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Conjunto de controle de ensaio padrão</b>	ACS_TissueHLC_200_V7_DSP
<b>Volume de eluição</b>	50, 100, 200 ou 400 µl
<b>Versão de software necessária</b>	Versão 4.0 ou superior
<b>Configuração de software necessária para uso em diagnóstico in vitro</b>	Perfil padrão 1

## Materiais necessários, mas não fornecidos

### Para todos os tipos de amostra

- Buffer ATL, 4 x 50 ml (nº de ref. 939016)
- Para minimizar o conteúdo de RNA: RNase A sem DNase (solução estoque de 100 mg/ml)

### Para tecido FFPE (desparafinização sem xileno)

- Deparaffinization Solution (nº de ref. 939018)

### Para tecido FFPE (desparafinização com xileno)

- Xileno (99–100%)
- Etanol (96 a 100%)\*

## Gaveta "Sample" (Amostra)

<b>Tipo de amostra</b>	Tecido e tecido FFPE
<b>Volume de amostra</b>	220 µl (exigido por amostra, por protocolo)*
<b>Volume de amostra processado</b>	200 µl
<b>Tubos de amostra primários</b>	n/a
<b>Tubos de amostra secundários</b>	Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> .
<b>Introdutores</b>	Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em <a href="http://www.qiagen.com">www.qiagen.com</a> .

\* Para protocolos de conteúdo alto e baixo, o sistema não reconhecerá se o volume de amostra for menor que 220 µl, pois a transferência de amostra é realizada sem a detecção do nível de líquido. Portanto, certifique-se de que o volume de entrada de amostra seja de 220 µl.

n/a = não aplicável.

## Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

<b>Posição A1 e/ou A2</b>	Cartucho de reagentes (Reagent cartridge, RC)
<b>Posição B1</b>	n/a
<b>Suporte de rack para ponteiras, 1-17</b>	Ponteiras com filtro descartáveis, 200 ou 1500 µl
<b>Suporte de caixa unitária, 1-4</b>	Caixas unitárias com cartuchos de preparo de amostras ou 8-Rod Covers

n/a = não aplicável.

\*Não use álcool desnaturado, que contém substâncias adicionais, como metanol ou metiletilcetona.

## Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitária, 1–4	Caixas unitárias vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte de recipiente de resíduos líquidos	Recipiente de resíduos líquidos vazio

## Gaveta "Eluate" (Eluato)

Rack de eluição (recomendamos o uso da fenda 1 na posição de resfriamento)

Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com).

## Materiais plásticos necessários

Materiais plásticos	Um lote 24 amostras*	Dois lotes 48 amostras*	Três lotes 72 amostras*	Quatro lotes 96 amostras*
Disposable filter-tips, 200 µl†	26	50	74	98
Disposable filter-tips, 1500 µl†	72	136	200	264
Sample prep cartridges§	21	42	63	84
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

\* Usar menos de 24 amostras por lote reduz o número de ponteiras com filtro descartáveis necessárias por execução.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteiras.

‡ O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por RC.

§ Há 28 cartuchos de preparo de amostras por caixa unitária.

¶ Há doze 8-Rod Covers por caixa unitária.

Nota: Dependendo das configurações, a quantidade de ponteiras com filtro referida pode diferir da quantidade exibida na tela sensível ao toque. Recomendamos carregar o maior número possível de ponteiras.

## Volume de eluição

O volume de eluição é selecionado na tela sensível ao toque. Dependendo do tipo de amostra e do conteúdo de DNA, o volume final pode variar até 15 µl menos que o volume selecionado. Como o volume de eluato pode variar, recomendamos verificar o volume real do eluato ao usar um sistema de configuração de ensaio automatizado que não verifique o volume de eluato antes da transferência. A eluição em volumes menores aumenta a concentração final de DNA, mas reduz ligeiramente o rendimento. Recomendamos o uso de um volume de eluição adequado para a aplicação a jusante pretendida.

## Preparo de material de amostra

Ao trabalhar com produtos químicos, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Para obter recomendações gerais sobre coleta, transporte e armazenamento, consulte a diretriz aprovada MM13-A do CLSI "Coleta, transporte, preparação e armazenamento de espécimes para métodos moleculares".

## O que fazer antes de começar

- Verifique o Buffer ATL quanto ao precipitado branco. Se necessário, incube durante 30 minutos a 37 °C com agitação ocasional para dissolver o precipitado.
- Coloque um termomisturador ou um agitador-incubador em temperatura exigida para o respectivo pré-tratamento.

## Tecidos

Tecidos frescos e congelados podem ser usados para purificação de DNA. O rendimento e a qualidade do DNA dependerão do tipo de tecido, fonte e condições de armazenamento. O tecido fresco pode ser cortado em pequenos pedaços e armazenado a -20 °C ou -80 °C antes do processamento. Em geral, recomendamos o uso do protocolo de alto conteúdo, que fornecerá maior rendimento de DNA. O protocolo de baixo conteúdo, em conjunto com o volume de eluição de 50 µl, só é recomendado se altas concentrações de DNA forem necessárias para a análise a jusante. Se nenhuma informação sobre o rendimento esperado estiver disponível, recomendamos começar com 25 mg de material de amostra usando o protocolo de alto conteúdo e o volume de eluição de 200 µl. Dependendo do rendimento obtido, o tamanho da amostra pode ser aumentado ou o volume de eluição pode ser diminuído nas preparações subsequentes. Esteja ciente de que as preparações de sobrecarga em combinação com pequenos volumes de eluição podem causar o carryover de partículas magnéticas para o eluato e comprometer a pureza do DNA e a análise a jusante.

**Nota:** Ao trabalhar com amostras de tecido congelado, a ISO 20184-3:2021 (E) para a extração automatizada do NA de amostras de tecido congelado deve ser considerada.

**Nota:** A estabilidade de amostra depende muito de vários fatores e está relacionada à aplicação a jusante específica. O usuário é responsável por consultar as instruções de uso da aplicação a jusante específica usada em seu laboratório e/ou validar todo o fluxo de trabalho para estabelecer as condições de armazenamento adequadas.

## Protocolo de pré-tratamento para tecido

1. Transfira a amostra de tecido para um tubo de microcentrífuga de 2 ml (não fornecido).
2. Adicione 220 µl de Buffer ATL.
3. Adicione 20 µl de proteinase K e misture tamborilando os dedos no tubo.

**Nota:** Use a proteinase K do rack de enzimas do QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.

4. Coloque o tubo em um termomisturador ou agitador-incubador e incube a 56 °C com agitação a 900 rpm até que o tecido esteja completamente lisado.

**Nota:** O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. Para a maioria dos tecidos, a lise é completada em 3 horas. Se a lise estiver incompleta após 3 horas, como indicado pela presença de material insolúvel, ou de lisados altamente viscosos, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser removido por centrifugação conforme descrito na etapa 6. A lise noturna é possível e não afeta a preparação.

5. Para minimizar o conteúdo de RNA na amostra, adicione 4 µl de RNase A (100 mg/ml) e incube durante 2 minutos em temperatura ambiente (15–25 °C) antes de prosseguir para a etapa 6.
6. Homogeneíze a amostra pipetando-a várias vezes para cima e para baixo.

**Nota:** Se pedaços de material insolúvel ainda estiverem presentes, centrifugue a 3000 g por 1 minuto.

7. Transfira cuidadosamente 220 µl do sobrenadante para os tubos de amostra compatíveis com o porta-amostras do QIAasymphony SP.
8. Para obter uma lista completa de tubos de amostra compatíveis, consulte a lista de materiais de laboratório em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Recomendamos o uso de tubos de 2 ml (por ex., Sarstedt, n° de ref. 72.693 ou 72.608). 0.

## Tecido FFPE

Os procedimentos FFPE sempre resultam em fragmentação significativa de ácidos nucleicos. Para limitar a extensão da fragmentação de DNA, certifique-se de:

- Corrigir as amostras de tecido em 4–10% de formalina o mais rápido possível após a remoção cirúrgica
- Usar um tempo de fixação de 14 a 24 horas (tempos de fixação mais longos levam a uma fragmentação de DNA acentuada, resultando em um desempenho ruim nos ensaios posteriores)
- Desidratar completamente as amostras antes da conservação (a formalina residual pode inibir a digestão da Proteinase K).

O material inicial para a purificação do DNA deve ter seções recém-cortadas de tecido FFPE. Até 4 seções, cada uma com uma espessura de até 10 µm, ou 8 seções, com uma espessura de até 5 µm e uma área de superfície de até 250 mm<sup>2</sup>, podem ser processadas em uma preparação. Se as informações sobre a natureza do seu material de partida não estiverem disponíveis, recomendamos começar com não mais que 3 seções em uma única preparação. Dependendo do rendimento e pureza do DNA, é possível usar até 8 seções nas preparações subsequentes.

**Nota:** Ao trabalhar com tecido FFPE, a ISO 20166-3:2018 (E) para a extração automatizada do NA de amostras de tecido FFPE deve ser considerada para obter informações adicionais sobre manipulação de amostras.

**Nota:** Os protocolos de tecido FFPE são especialmente projetados apenas para copurificar pequenas quantidades de RNA. Isso levará a um valor de medição fotométrica reduzido em comparação com os valores obtidos com o manual do QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit.

### Protocolo de pré-tratamento de tecido FFPE

Método 1: desparafinização usando solução de desparafinização

1. Usando um bisturi, corte o excesso de parafina do bloco de amostra.
2. Corte até 4 seções de 10 µm de espessura ou até 8 seções de 5 µm de espessura.  
Nota: Se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, descarte as primeiras 2–3 seções.
3. Coloque imediatamente as seções em um tubo Sarstedt de 2 ml (não fornecido, nº de ref. 72.693 ou 72.608) que seja compatível com o transportador de amostras do QIASymphony SP.
4. Adicione 200 µl de Buffer ATL às seções.
5. Adicione 20 µl de proteinase K.

Nota: Use a proteinase K do rack de enzimas do QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

6. Adicione 160 µl ou 320 µl de solução de desparafinização (consulte a tabela abaixo) e agite em vórtex.

Espessura das seções	Número de seções	Volume da solução de desparafinização
5 µm	1–4	160 µl
	5–8	320 µl
10 µm	1–2	160 µl
	3–4	320 µl

7. Coloque o tubo em um ThermoMixer ou agitador-incubador e incube a 56 °C por 1 hora com agitação a 1000 rpm até que o tecido esteja completamente lisado.

Nota: O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. Para a maioria dos tecidos, a lise é completada em 1 hora. Se a lise estiver incompleta após 1 hora, como indicado pela presença de material insolúvel, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser peletizado por centrifugação conforme descrito na etapa 10. A lise noturna é possível e não afeta a preparação.

8. Incube a 90 °C por 1 hora.

Nota: A incubação a 90 °C em Buffer ATL reverte parcialmente a modificação do formaldeído de ácidos nucleicos. Tempos de incubação mais longos ou temperaturas de incubação mais altas podem resultar em um DNA mais fragmentado. Se utilizar apenas um bloco de aquecimento, deixe a amostra em temperatura ambiente após a incubação a 56 °C até o bloco de aquecimento atingir 90 °C.

9. Para minimizar o conteúdo de RNA na amostra, adicione 2 µl de RNase A (100 mg/ml) à fase inferior e incube por 2 minutos em temperatura ambiente antes de prosseguir para a etapa 10. Deixe a amostra esfriar em temperatura ambiente antes de adicionar a RNase A.

10. Centrifugue à velocidade máxima durante 1 minuto em temperatura ambiente.

11. Transfira cuidadosamente os tubos (contendo ambas as fases) para o porta-amostras do QIA Symphony SP.

## Método 2: desparafinização usando xileno

1. Usando um bisturi, corte o excesso de parafina do bloco de amostra.

2. Corte até 4 seções de 10 µm de espessura ou até 8 seções de 5 µm de espessura.

Nota: Se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, descarte as primeiras 2–3 seções.

3. Coloque imediatamente as seções em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ou 2 ml (não fornecido) e adicione 1 ml de xileno à amostra. Feche a tampa e agite em vórtex vigorosamente por 10 segundos.

4. Centrifugue à velocidade máxima durante 2 minutos em temperatura ambiente.

5. Remova o sobrenadante fazendo a pipetagem. Não remova qualquer porção do pellet.

6. Adicione 1 ml de etanol (96–100%) ao pellet e agite em vórtex.

Nota: O etanol extrai o xileno residual da amostra.

7. Centrifugue à velocidade máxima durante 2 minutos em temperatura ambiente.

8. Remova o sobrenadante fazendo a pipetagem. Não remova qualquer porção do pellet.

Nota: Remova cuidadosamente qualquer etanol residual usando uma ponteira de pipeta fina.

9. Abra o tubo e incube em temperatura ambiente (15–25 °C) por 10 minutos ou até que todo o etanol residual tenha evaporado.

Nota: A incubação pode ser realizada a temperaturas até 37 °C.

10. Ressuspenda o pellet em 220 µl de Buffer ATL.

11. Adicione 20 µl de proteinase K e misture agitando em vórtex.

Nota: Use a proteinase K do rack de enzimas do QIA Symphony DSP DNA Mini Kit.

12. Incube a 56 °C por 1 hora (ou até que a amostra tenha sido completamente lisada).

Nota: O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. Para a maioria dos tecidos, a lise é completada em 1 hora. Se a lise estiver incompleta após 1 hora, como indicado pela presença de material insolúvel, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser removido por centrifugação conforme descrito na etapa 16. A lise noturna é possível e não afeta a preparação.

13. Incube a 90 °C por 1 hora.

Nota: A incubação a 90 °C em Buffer ATL reverte parcialmente a modificação do formaldeído de ácidos nucleicos. Tempos de incubação mais longos ou temperaturas de incubação mais altas podem resultar em um DNA mais fragmentado. Se utilizar apenas um bloco de aquecimento, deixe a amostra em temperatura ambiente após a incubação a 56 °C até o bloco de aquecimento atingir 90 °C.

14. Centrifugue brevemente a amostra para remover as gotas de dentro da tampa.

15. Para minimizar o conteúdo de RNA na amostra, adicione 2 µl de RNase A (100 mg/ml) e incube durante 2 minutos em temperatura ambiente antes de prosseguir para a etapa 16. Deixe a amostra esfriar em temperatura ambiente antes de adicionar a RNase A.

16. Transfira cuidadosamente 220 µl do lisado para os tubos de amostra compatíveis com o transportador de amostras do QIAAsymphony SP.

Nota: Se os lisados contiverem material não digerido, centrifugue à velocidade máxima por 2 minutos em temperatura ambiente antes de transferir o sobrenadante para os tubos de amostra. Para obter uma lista completa de tubos de amostra compatíveis, consulte a lista de materiais de laboratório em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com). Recomendamos o uso de tubos de 2 ml (por ex., Sarstedt, nº de ref. 72.693 ou 72.608).

## Armazenamento de eluatos

Recomenda-se remover a placa de eluato da gaveta "Eluate" (Eluato) imediatamente após o término da execução. As placas de eluição podem ser deixadas no QIAAsymphony SP após a conclusão da execução de um dia para outro (máximo de 12 horas incluindo o tempo de execução; condições ambientais recomendadas: 18–26 °C e umidade relativa de 20–75%). Dependendo da temperatura e umidade, o eluato pode sofrer condensação ou evaporação.

Para o armazenamento a curto prazo, os eluatos podem ser armazenados em temperatura ambiente até 2 semanas. Para o armazenamento prolongado, recomendamos o armazenamento a 2–8 °C, -20 °C, ou -80 °C

Nota: A estabilidade do eluato depende muito de vários fatores e está relacionada à aplicação a jusante específica. Ela foi estabelecida para o QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit em conjunto com as aplicações a jusante exemplares. O usuário é responsável por consultar as instruções de uso da aplicação a jusante específica usada em seu laboratório e/ou validar todo o fluxo de trabalho para estabelecer as condições de armazenamento adequadas.

## Ponto importante antes de começar

- As partículas magnéticas do QIAAsymphony copurificam o RNA e DNA se ambos estiverem presentes na amostra. Se for necessário DNA livre de RNA, adicione RNase A à amostra na etapa indicada no respectivo protocolo de pré-tratamento.

## Limitações e substâncias interferentes





Durante o desenvolvimento do QIAAsymphony DSP DNA Mini Kit, nenhuma substância interferente apresentou um impacto negativo no preparo de amostras.

Nota: Os testes foram realizados usando aplicações a jusante exemplares para uma avaliação da qualidade dos ácidos nucleicos extraídos. Contudo, as diferentes aplicações a jusante podem ter requisitos diferentes em relação à pureza (ou seja, a ausência de substâncias potencialmente interferentes), assim, a identificação e o teste de substâncias relevantes também precisam ser estabelecidos como parte do desenvolvimento de aplicações a jusante para qualquer fluxo de trabalho envolvendo os QIAAsymphony DSP DNA Mini Kits.



## Símbolos

Os seguintes símbolos aparecem neste documento. Para obter uma lista completa dos símbolos usados nestas instruções de uso ou na embalagem e etiqueta, consulte o manual.

Símbolo	Definição do símbolo
	Este produto atende aos requisitos do Regulamento Europeu 2017/746 para dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Número de referência
<b>Rn</b>	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Fabricante

## Histórico de revisões

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	Versão 2, Revisão 1 <ul style="list-style-type: none"><li>• Atualização para a versão 2 para conformidade com o IVD</li><li>• Adição da seção Limitações e substâncias interferentes</li><li>• Adição da seção Armazenamento de eluatos</li><li>• Adição da seção Símbolos</li><li>• Atualização da seção Preparo de material de amostra</li></ul>

Para obter informações atualizadas sobre licenças e avisos legais específicos de produtos, consulte o manual do usuário ou o manual do respectivo kit QIAGEN®. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Marcas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIASymphony® (QIAGEN Group); BD™ (Becton Dickinson and Company) ; Sarstedt® (Sarstedt AG and Co.). Os nomes registrados, as marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.  
06/2022 HB-3029-S07-001© 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.