

Instruções de uso (Manual) do QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit



50

Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemanha



R1 1127632PTBR

Conteúdo

Uso previsto	4
Usuário previsto	4
Descrição e princípio	5
Volumes das amostras.....	5
Lise de amostras.....	7
Adsorção para a membrana da coluna QIAamp Mini.....	7
Remoção de contaminantes residuais.....	7
Eluição de ácidos nucleicos puros	8
Tamanho e rendimento dos ácidos nucleicos	8
Descrição dos protocolos	9
Resumo e explicação	9
Materiais fornecidos	10
Conteúdo do kit	10
Componentes do kit.....	11
Materiais necessários, mas não fornecidos	12
Reagentes adicionais	12
Produtos consumíveis	12
Equipamento.....	13
Avisos e precauções	14
Informações de segurança.....	14
Informações de emergência.....	15
Precauções	15

Descarte.....	16
Armazenamento e manuseio de reagentes	17
Estabilidade em uso.....	17
Armazenamento e manuseio de espécimes.....	18
Procedimento	19
Preparação de tampões e reagentes	26
Protocolo Breeze: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano	29
Protocolo clássico: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano	34
Controle de qualidade	39
Limitações	39
Características de desempenho	40
Referências	41
Guia de solução de problemas	42
Símbolos	45
Anexo A: Recomendação para separação e armazenamento do plasma sanguíneo	48
Anexo B: Observações gerais sobre o manuseio de RNA.....	50
Informações sobre pedidos	51
Histórico de revisões do documento.....	52

Uso previsto

O QIAamp DSP Circulating NA Kit é um sistema que usa tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para isolamento e purificação manual de DNA e RNA circulantes e livres de células de amostras de plasma sanguíneo humano.

O QIAamp DSP Circulating NA Kit deve ser usado para diagnóstico in vitro.

Usuário previsto

O produto deve ser usado por usuários profissionais, como técnicos e médicos, que são treinados em técnicas biológicas moleculares.

Descrição e princípio

O procedimento do QIAamp DSP Circulating NA é composto por 4 etapas (lise, ligação, lavagem e eluição) e é realizado usando colunas QIAamp Mini no sistema QIAvac. O procedimento robusto ajuda a minimizar a contaminação cruzada, entre amostras, e aumenta a segurança do usuário ao manusear amostras potencialmente infecciosas.

O procedimento simples é adequado para processamentos simultâneos de até 24 amostras em menos de 2 horas.

Volumes das amostras

As colunas QIAamp Mini ligam ácidos nucleicos fragmentados que tenham no máximo 20 nt, mas o resultado depende do volume da amostra e da concentração de ácidos nucleicos circulantes na amostra (normalmente de 1–100 ng/ml no plasma). O procedimento do QIAamp DSP Circulating NA foi otimizado para volumes de amostras, de até 5 ml.

Procedimento do QIAamp
DSP Circulating NA Kit

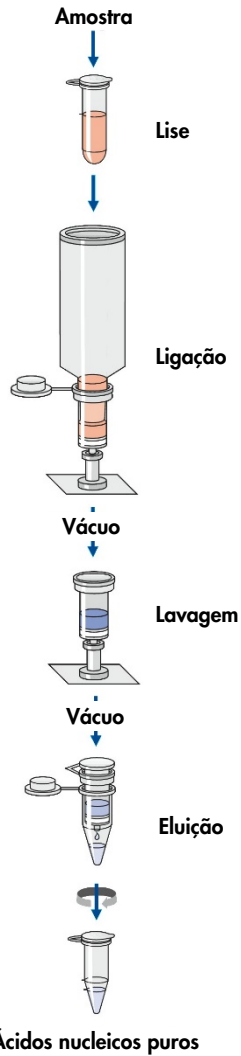


Figura 1. Visão geral do procedimento do QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Lise de amostras

Os ácidos nucleicos de livre circulação em fluidos biológicos são, normalmente, ligados a proteínas ou envelopados em vesículas, precisando de uma etapa de lise eficiente para liberar esses ácidos nucleicos para ligação seletiva à coluna QIAamp Mini. Portanto, as amostras são lisadas em condições de alta desnaturação, a temperaturas elevadas na presença de proteinase K e Buffer ACL, que garantem a desativação das DNases e RNases e a liberação de ácidos nucleicos das proteínas, lipídios e vesículas ligados.

Adsorção para a membrana da coluna QIAamp Mini

Para permitir a ligação ideal dos ácidos nucleicos circulantes à membrana, as condições de ligação são ajustadas através da adição de Buffer ACB ao lisado. Os lisados são, em seguida, transferidos para uma coluna QIAamp Mini e os ácidos nucleicos circulantes são adsorvidos de um grande volume para a membrana de sílica, enquanto o lisado é retirado por uma pressão a vácuo. As condições de sal e de pH garantem que a maioria das proteínas e outros contaminantes, que podem inibir a reação da cadeia de polimerase (PCR) e outras reações enzimáticas a jusante, não é retida na membrana da coluna QIAamp Mini.

Um coletor a vácuo (por ex., QIAvac 24 Plus com o QIAvac Connecting System) e uma bomba de vácuo capaz de produzir um vácuo de ~800–900 mbar (por ex., QIAGEN® Vacuum Pump) são necessários para o protocolo. Deve ser usado um Vacuum Regulator (parte do QIAvac Connecting System) para fácil monitoramento da pressão a vácuo e liberação de vácuo conveniente.

Remoção de contaminantes residuais

Os ácidos nucleicos permanecem ligados à membrana, enquanto os contaminantes são eficientemente lavados durante três etapas de lavagem.

Eluição de ácidos nucleicos puros

A eluição é realizada usando Buffer AVE. Em uma única etapa, ácidos nucleicos circulantes altamente puros são eluídos em Buffer AVE, equilibrado à temperatura ambiente. É possível aplicar um volume de eluição flexível de 50–150 µl. Se concentrações mais altas de ácido nucleico forem necessárias, o volume de eluição pode ser reduzido para baixo, até 20 µl. Os volumes de eluição inferiores a 50 µl levam a eluatos de ácido nucleico altamente concentrados, mas podem resultar em um rendimento total inferior.

O volume de eluato recuperado poderá ser até 5 µl menor do que o volume de tampão de eluição aplicado na coluna.

Tamanho e rendimento dos ácidos nucleicos

Os rendimentos dos ácidos nucleicos de circulação livre isolados de amostras biológicas são, normalmente, abaixo de 1 µg e são, portanto, difíceis de determinar com um espectrofotômetro. O rendimento absoluto de DNA e RNA obtido de uma amostra usando o QIAamp DSP Circulating NA Kit varia entre amostras de diferentes indivíduos e também depende de outros fatores (por ex., certos estados de doenças). Além disso, o RNA carreador presente nos ácidos nucleicos extraídos provavelmente dominará as leituras de absorbância de UV (consulte a página 27). Os métodos de amplificação quantitativa são recomendados para determinação de rendimentos.

A distribuição do tamanho dos ácidos nucleicos circulantes purificados usando o QIAamp DSP Circulating NA Kit pode ser verificada por eletroforese em gel de agarose ou hibridização para uma sonda rotulada específica do alvo (1) ou uma solução de eletroforese microfluídica (por ex., Agilent® Bioanalyzer).

Descrição dos protocolos

Este manual fornece dois protocolos diferentes.

- O "Protocolo Breeze: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano" (página 29) é adequado para o processamento de até 5 ml de plasma em etapas de 1 ml e foi otimizado para proporcionar um tempo mais curto de manipulação e resposta.
- O "Protocolo clássico: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano" (página 34) é adequado para o processamento de até 5 ml de plasma em etapas de 1 ml e representa o protocolo inalterado do *Manual do QIAamp DSP Circulating NA Kit*, versão 1, revisão 3 (R3).

Resumo e explicação

Ácidos nucleicos de circulação livre estão presentes no plasma humano, normalmente como fragmentos curtos, <1000 bp (DNA) <1000 nt (RNA) ou pequenos, como, por exemplo, 20 nt (miRNAs). A concentração de ácidos nucleicos de circulação livre no plasma sanguíneo humano é normalmente baixa e varia consideravelmente entre indivíduos, variando de 1–100 ng/ml em amostras humanas (2–6).

O QIAamp DSP Circulating NA Kit permite a purificação eficaz dos ácidos nucleicos circulantes no plasma humano. As amostras podem ser tanto frescas como congeladas. Os tubos de extensão e o processamento de vácuo no QIAvac 24 Plus permite volumes iniciais de amostra de até 5 ml e os volumes de eluição flexível entre 20 µl e 150 µl permitem a concentração de amostras de ácido nucleico que estão presentes em concentrações baixas.

DNA ou RNA genômico de livre circulação eluído está disponível para uso em aplicações a jusante ou é adequado para armazenamento. O usuário deve otimizar a inserção de plasma e o volume de eluição para os alvos específicos e aplicações a jusante em seus laboratórios.

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
Nº de ref.	61504
Número de preparações	50

	Identificação	Símbolos	Quantidade
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Colunas QIAamp Mini com tubos de lavagem) (WT) (2 ml)		50
EXT	Column Extenders (Extensores de coluna) (20 ml)		2 x 25
WT	Wash Tubes (Tubos de lavagem) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml)		50
VC	VacConnectors (Conectores de vácuo)		50
ACL*	Lysis Buffer* (Tampão de lise)		220 ml
ACB*	Binding Buffer* (Tampão de ligação – concentrado)		300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (Tampão de lavagem 1 – concentrado)		19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (Tampão de lavagem 2 – concentrado)		13 ml
AVE†	Elution Buffer† (Tampão de eluição – tampas roxas)		5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinase K QIAGEN)		4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (RNA carreador) (tampas vermelhas)		310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Colunas QIAamp Mini com tubos de lavagem) (WT) (2 ml)		50
	Manual		1

* Contém um sal caotrópico. Consulte a página 14 sobre Avisos e precauções.

† Contém azida de sódio como conservante.

Componentes do kit

Os componentes principais do kit são explicados abaixo.

Tabela 1. Ingredientes ativos nos reagentes fornecidos

Reagente		Ingrediente ativo	Concentração
Símbolo	Nome		
ACL	Lysis Buffer (Tampão de lise)	Tiocianato de guanidina	≥30 a <50% w/w
ACB	Binding Buffer (Tampão de ligação – concentrado)	Tiocianato de guanidina	≥30 a <50% w/w
ACW1	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1 – concentrado)	Cloridrato de guanidina	≥30 a <60% w/w
ACW2	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 1 – concentrado)	Nenhum	–
AVE	Elution Buffer (Tampão de eluição – tampas roxas)	Nenhum	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinase K QIAGEN)	Proteinase K	≥1 a <3% w/w
Carrier	Carrier RNA (RNA carreador) (tampas vermelhas)	Nenhum	–

Controles e calibradores

Para minimizar o risco de qualquer impacto negativo nos resultados do diagnóstico gerados após o isolamento, devem ser usados controles adequados para aplicações posteriores.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Reagentes adicionais

- Etanol (96–100%)*
- Isopropanol (100%)
- Gelo triturado (apenas para o "Protocolo clássico: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano".)
- Algumas amostras podem exigir a diluição com tampão fosfato-salino (PBS)

Produtos consumíveis

- Pipetas (ajustáveis)
- Pontas de pipetas estéreis (recomenda-se o uso de pontas de pipeta com barreiras de aerossol, para ajudar a evitar a contaminação cruzada)
- Tubos isentos de nuclease de 1,5 ml ou 2 ml
- Tubos de centrifuga de 50 ml

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

Equipamento

- Banho-maria ou bloco de aquecimento, capaz de comportar tubos de centrifuga de 50 ml a 56 °C ou 60 °C.*
- Bloco de aquecimento ou semelhante a 56 °C capaz de comportar tubos de lavagem de 2 ml (apenas para o Protocolo clássico)*
- Agitador tipo vórtex
- Microcentrífuga (com rotor para tubos de 2 ml)*
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (Coletor de vácuo QIAvac 24 Plus) (n° de ref. 19413)
- QIAvac Connecting System (Sistema de conexão QIAvac) (número do catálogo 19419) ou equivalente
- Vacuum Pump (n° de ref. 84010 [EUA e Canadá], 84000 [Japão] ou 84020 [resto do mundo]) ou bomba equivalente, capaz de produzir um vácuo de -800 a -900 mbar
- Opcional: VacValves (n° de ref. 19408)

* Certifique-se de que os instrumentos foram verificados e calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Avisos e precauções

Esteja ciente de que poderá ser necessário consultar seus regulamentos locais para relatar incidentes graves que tenham ocorrido em relação ao dispositivo ao fabricante e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Para uso em diagnóstico in vitro

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco apropriado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF conveniente e compacto, em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir as SDSs para cada kit e componente do kit QIAGEN.

AVISO

Risco de lesões corporais



NÃO adicione alvejante ou soluções ácidas diretamente nos resíduos do preparo de amostras.

O Buffer ACL, Buffer ACB e Buffer ACW1 contêm sais de guanidina, que podem formar compostos altamente reativos, quando combinados com alvejante.

Se líquido contendo essas soluções tamponadas for derramado, limpe com água e detergente de laboratório adequado. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpe a área afetada primeiro com água e detergente de laboratório e, em seguida, com solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v).

- Espécimes e amostras são potencialmente infecciosos. Descarte os resíduos das amostras e dos ensaios de acordo com os procedimentos de segurança locais.

Informações de emergência

CHEMTREC

EUA e Canadá 1-800-424-9300

Fora dos EUA e do Canadá +1703-527-3887

Precauções

As seguintes afirmações de risco e precauções se aplicam a componentes do QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo, se engolido. Pode ser nocivo em contato com a pele ou se inalado. Causa queimaduras graves na pele e lesões oculares. Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Em contato com ácidos, libera gases muito tóxicos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. Entre em contato imediatamente com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou um médico.

Buffer ACL



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo, se engolido. Pode ser nocivo em contato com a pele ou se inalado. Causa queimaduras graves na pele e lesões oculares. Nocivo para a vida aquática, com efeitos duradouros. Em contato com ácidos, libera gases muito tóxicos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. EM CASO DE CONTATO COM OS OLHOS: Enxágue cuidadosamente com água por vários minutos. Remova lentes de contato, se presentes e fáceis de remover. Continue enxaguando. Entre em contato imediatamente com um CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES E ENVENENAMENTOS ou um médico.

Buffer ACW1



Contém: cloridrato de guanidina. Aviso! Nocivo, se engolido ou inalado. Provoca irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Retire a roupa contaminada e lave-a antes de usá-la novamente. Descarte o conteúdo/recipiente em um local de descarte de resíduos aprovado.

Proteinase K



Contém: Proteinase K. Perigo! Causa irritação leve da pele. Se inalado pode causar sintomas de asma ou alergia, ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/névoa/vapores/spray. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Use proteção respiratória. Em caso de exposição ou suspeita de exposição: contate um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Leve a pessoa para um local ao ar livre e deixe-a confortável para respirar. Descarte o conteúdo/recipiente em um local de descarte de resíduos aprovado.

Descarte

O resíduo contém amostras e reagentes. Esse resíduo pode conter material tóxico ou infeccioso e deve ser descartado corretamente. Consulte os regulamentos de segurança locais para ver quais são os procedimentos de descarte adequados.

Para mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) aplicáveis. Elas estão disponíveis online em formato PDF em www.qiagen.com/safety, no qual é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS de cada kit e componente de kit QIAGEN.

Armazenamento e manuseio de reagentes

As colunas QIAamp Mini devem ser armazenadas secas a 2–8 °C. Todos os tampões devem ser armazenados à temperatura ambiente (15–25 °C). As colunas e os tampões QIAamp Mini podem ser armazenados nessas condições, até a data de validade informada na caixa do kit, sem mostrar nenhuma redução de desempenho.

O RNA carreador liofilizado deve ser armazenado à temperatura ambiente (15–25 °C), até a data de validade informada no rótulo do componente. O RNA carreador deve ser dissolvido em Buffer AVE. O RNA carreador dissolvido deve ser adicionado imediatamente ao Buffer ACL, conforme descrito na página 30 para o Protocolo Breeze e na página 35 para o Protocolo clássico. Esta solução deve ser preparada na hora. As partes não usadas do RNA carreador dissolvidas no Buffer AVE devem ser congeladas em alíquotas, entre -30 e -15 °C.

O QIAamp DSP Circulating NA Kit contém uma solução de proteinase K pronta para uso, que é dissolvida em uma solução tampão de armazenamento especialmente formulada. A proteinase K fica estável, até a data de validade informada no rótulo do documento, quando armazenada à temperatura ambiente (15–25 °C).

Estabilidade em uso

O kit pode ser usado por 12 meses após o primeiro uso ou até a data de validade, o que acontecer antes.

Armazenamento e manuseio de espécimes

Armazenamento e manuseio de sangue

Para evitar a degradação de ácidos nucleicos livres de células e a liberação de ácidos nucleicos celulares, recomendamos que o sangue total seja armazenado por no máximo 6 horas a uma temperatura de 2 a 8 °C (por ex., amostras de EDTA). Se estiver utilizando tubos de coleta de sangue estabilizado, considere as condições de armazenamento fornecidas pelo fabricante. Recomendamos a validação dessas condições de armazenamento em combinação com sua aplicação a jusante e alvo específicos.

Armazenamento e manuseio de plasma

É recomendado efetuar a separação do plasma e o isolamento de ácido nucleico imediatamente após a doação de sangue ao usar EDTA como anticoagulante, principalmente para RNA. Para armazenamentos de curta duração, o plasma pode ser armazenado por até 24 horas a uma temperatura de 2 a 8 °C.

Para armazenamentos de maior duração, é possível armazenar alíquotas de plasma de tubos de coleta de sangue estabilizado e não estabilizado a -20 °C ou -80 °C por até 12 meses (apenas pra DNA como alvo) ou a -80 °C por 4 semanas (para RNA como alvo).

Armazenamento de ácidos nucleicos eluídos

Ácidos nucleicos eluídos são coletados em tubos de eluição de 1,5 ml (fornecidos). É possível armazenar os ácidos nucleicos circulantes purificados por até 24 horas a uma temperatura de 2 a 8 °C. Para períodos de armazenamento superiores a 24 horas, recomenda-se o armazenamento de DNA a uma temperatura de -30 a -15 °C e de aplicações a jusante de RNA a -90 a -60 °C.

Procedimento

Pontos importantes antes de começar

O QIAvac 24 Plus

O QIAvac 24 Plus foi criado para processamento a vácuo rápido e eficiente de até 24 colunas de centrifugação QIAGEN em paralelo. As amostras e soluções de lavagem são retiradas pelas membranas da coluna por vácuo, em vez de centrifugação, proporcionando velocidade maior e menos tempo de uso das mãos em procedimentos de purificação.

Em combinação com o QIAvac Connecting System, o QIAvac 24 Plus pode ser usado como sistema de passagem. A passagem da amostra é coletada em um frasco de resíduos separado.

Para manutenção do QIAvac 24 Plus, consulte as diretrizes de manuseio no manual do *QIAvac 24 Plus*.

Processamento das colunas do QIAamp Mini no QIAvac 24 Plus

As colunas do QIAamp Mini são processadas no QIAvac 24 Plus usando VacConnectors descartáveis e VacValves reutilizáveis. As VacValves (opcionais) são inseridas diretamente nos slots luer do coletor do QIAvac 24 Plus e garantem uma taxa de fluxo constante, facilitando o processamento paralelo de diferentes volumes de amostra. Elas devem ser usadas se as taxas de fluxo da amostra diferirem significativamente, para garantir um vácuo consistente. Os VacConnectors são conectores descartáveis que se encaixam entre as colunas do QIAamp Mini e as VacValves ou entre as colunas do QIAamp Mini e os slots luer do QIAvac 24 Plus. Eles impedem o contato direto entre a coluna giratória e a VacValve durante a purificação, evitando, assim, a contaminação cruzada entre amostras. Os VacConnectors são descartados depois de um único uso. Devido aos grandes volumes de solução usados, o QIAvac Connecting System (ou uma configuração semelhante com frascos) é necessário (consulte a Figura 2).

Diretrizes de manuseio para o QIAvac 24 Plus

- Sempre coloque o QIAvac 24 Plus em uma bancada ou área de trabalho segura. Em caso de queda, o coletor QIAvac 24 Plus pode rachar.
- Guarde sempre o QIAvac 24 Plus limpo e seco. Para obter os procedimentos de limpeza, consulte o *Manual do QIAvac 24 Plus*.
- Os componentes do QIAvac 24 Plus não são resistentes a certos solventes (Tabela 2). Se esses solventes forem derramados na unidade, lave completamente com água.
- Para garantir desempenho consistente, não aplique silicone ou graxa a vácuo em nenhuma peça do coletor QIAvac 24 Plus.
- Tenha sempre cuidado e use óculos de segurança ao trabalhar próximo a um coletor a vácuo sob pressão.
- Entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local, para obter informações com relação a peças sobressalentes ou de reposição.
- A pressão do vácuo é a pressão diferencial entre a parte interna do coletor a vácuo e a atmosfera (pressão atmosférica padrão de 1013 millibar ou 760 mm Hg) e pode ser medida usando o QIAvac Connecting System (consulte a Figura 2). Os protocolos requerem uma bomba de vácuo, capaz de produzir um vácuo ou -800 a -900 mbar (por ex., QIAGEN Vacuum Pump). Pressões de vácuo maiores devem ser evitadas. O uso de pressões de vácuo menores que o recomendado pode reduzir o rendimento e a pureza do ácido nucleico e aumentar o risco de entupimento de membranas.

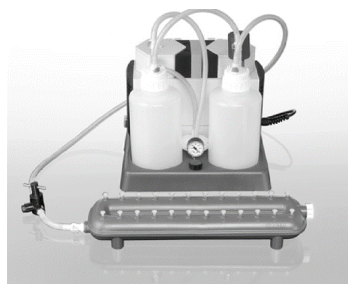


Figura 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System e Vacuum Pump.

Tabela 2. Propriedades de resistência química do QIAvac 24 Plus

Resistente a		Não resistente a
Ácido acético	Sais caotrópicos	Benzeno
Ácido crômico	Álcoois concentrados	Fenol
SDS	Cloreto de sódio	Clorofórmio
Tween™ 20	Ureia	Tolueno
Alvejante com cloro	Ácido clorídrico	Éteres
Hidróxido de sódio		

Configuração do QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Conecte o QIAvac 24 Plus a uma fonte de vácuo. Se estiver usando o QIAvac Connecting System, conecte o sistema ao coletor e à fonte de vácuo, conforme descrito no Anexo A do *Manual do QIAvac 24 Plus*.
2. Insira uma VacValve (opcional) em cada slot luer do QIAvac 24 Plus que deve ser usado (consulte a Figura 3). Feche os slots luer não usados com plugues luer ou feche a VacValve inserida.

As VacValves devem ser usadas se as taxas de fluxo das amostras diferirem significativamente, para garantir um vácuo consistente.

3. Insira um VacConnector em cada VacValve (consulte a Figura 3).
Execute essa etapa diretamente antes de iniciar a purificação, para evitar a exposição de VacConnectors a possíveis contaminantes presentes no ar.
4. Coloque as colunas do QIAamp Mini nos VacConnectors no coletor (consulte a Figura 3).

Nota: Guarde o tubo de lavagem do plástico bolha para usar no protocolo de purificação.

5. Insira um extensor de coluna (20 ml) em cada coluna do QIAamp Mini (consulte a Figura 3).

Nota: Certifique-se de que o extensor de coluna esteja firmemente inserido na coluna QIAamp Mini, para evitar vazamento de amostra.

6. Para a purificação do ácido nucleico, siga as instruções nos protocolos. Descarte os VacConnectors corretamente, depois do uso.

Dixe a tampa da coluna do QIAamp Mini aberta, enquanto aplica o vácuo.

Desligue o vácuo entre as etapas, para garantir que um vácuo consistente e constante seja aplicado durante o processamento. Para uma liberação de vácuo mais rápida, deve ser usado um Vacuum Regulator (parte do QIAvac Connecting System).

Nota: Cada VacValve pode ser fechada individualmente quando a amostra tiver sido completamente retirada pela coluna giratória, permitindo o processamento paralelo de amostras de diferentes volumes ou viscosidades.

7. Depois do processamento de amostras, limpe o QIAvac 24 Plus (consulte "Limpeza e descontaminação do QIAvac 24 Plus" no manual do *QIAvac 24 Plus*).

Nota: O Buffer ACL, Buffer ACB e Buffer ACW1 não são compatíveis com os agentes de desinfecção que contêm alvejante. Consulte a página 14 sobre Avisos e precauções.

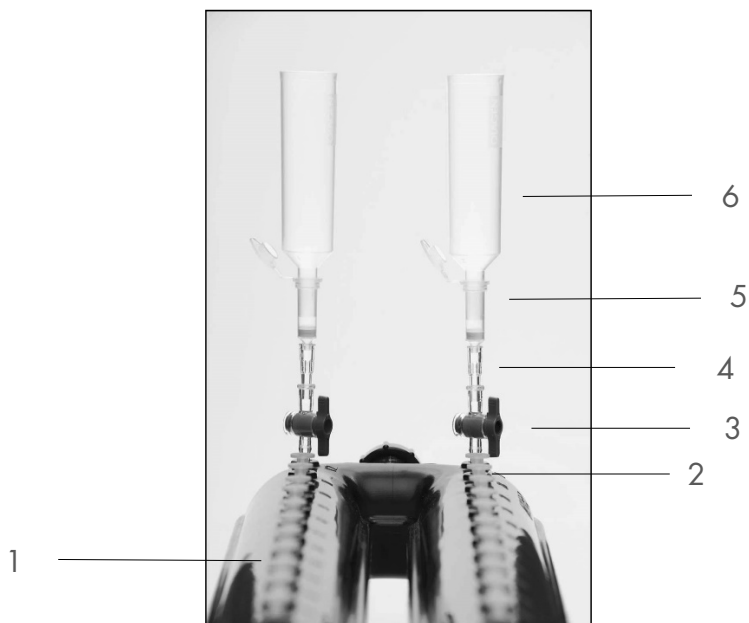
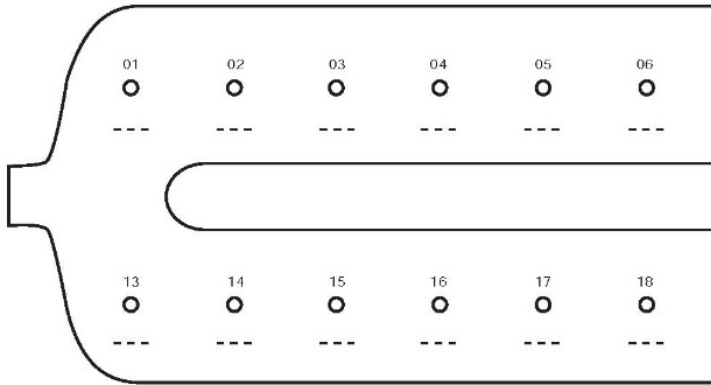


Figura 3. Configuração do QIAvac 24 Plus com colunas QIAamp Mini usando VacValves, VacConnectors e extensores de colunas.

- | | | | |
|----------|-------------------------------------------------------|----------|--------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Slot luer do QIAvac 24 Plus (fechado com plugue luer) | 5 | Coluna QIAamp Mini |
| 3 | VacValve* | 6 | Extensor de coluna |

Recomendamos rotular os tubos e as colunas QIAamp Mini para uso no sistema de vácuo QIAvac 24 Plus, de acordo com o esquema na Figura 4, para evitar a mistura de amostras. Essa figura pode ser fotocopiada e rotulada com os nomes das amostras.

* Deve ser adquirida separadamente.



Data: _____

Operador: _____

ID da execução: _____

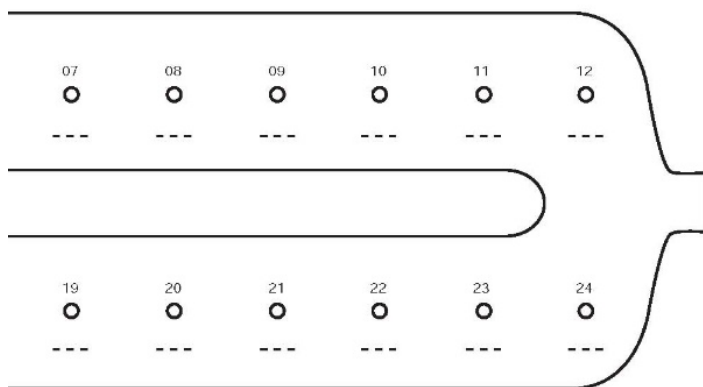


Figura 4. Esquema de rotulagem para tubos e colunas QIAamp Mini para uso no sistema de vácuo QIAvac 24 Plus.

Preparação de tampões e reagentes

Buffer ACB

Antes de usar, adicione 200 ml de isopropanol (100%) a 300 ml de concentrado de Buffer ACB, para obter 500 ml de Buffer ACB. Misture bem, depois de adicionar o isopropanol.

Buffer ACW1 *

Antes de usar, adicione 25 ml de etanol (96–100%) a 19 ml de concentrado de Buffer ACW1, para obter 44 ml de Buffer ACW1. Misture bem, depois de adicionar o etanol.

Buffer ACW2†

Antes de usar, adicione 30 ml de etanol (96–100%) a 13 ml de concentrado de Buffer ACW2, para obter 43 ml de Buffer ACW2. Misture bem, depois de adicionar o etanol.

Adição de RNA carreador ao Buffer ACL*

O RNA carreador tem duas finalidades: em primeiro lugar, ele aprimora a ligação dos ácidos nucleicos à membrana QIAamp Mini, especialmente se houver algumas moléculas-alvo na amostra. Em segundo lugar, a adição de grandes quantidades de RNA carreador reduz a chance de degradação do RNA no raro evento de que moléculas de RNase escapem da desnaturação por sais caotrópicos e detergentes no Buffer ACL.

A quantidade de RNA carreador liofilizado fornecida é suficiente para o volume de Buffer ACL fornecida com o kit. A concentração recomendada do RNA carreador foi ajustada, de modo que o protocolo de QIAamp DSP Circulating NA não possa ser usado como um sistema de purificação genérico compatível com muitos sistemas de amplificação diferentes e seja adequado para uma ampla gama de alvos de RNA e DNA.

* Contém um sal caotrópico. Consulte a página 14 sobre **Avisos e precauções**.

† Contém azida de sódio como conservante.

Diferentes sistemas de amplificação variam em eficiência, dependendo da quantidade total de ácidos nucleicos presentes na reação. Eluídos desse kit contêm tanto ácidos nucleicos circulantes quanto RNA carreador e, na maioria dos casos, a quantidade de RNA carreador excederá, e muito, a quantidade de ácidos nucleicos circulantes. Portanto, a quantificação de ácidos nucleicos circulantes isolados por leitura de absorbância de UV não será adequada, pois os resultados dessa medição são determinados pela presença de RNA carreador.

Para obter os níveis mais elevados de sensibilidade em reações de amplificação, pode ser necessário para reduzir a quantidade de RNA carreador adicionado ao Buffer ACL.

Para sistemas de amplificação que envolvem primers oligo dT, nenhum RNA carreador deverá ser adicionado durante o isolamento de ácidos nucleicos de circulação livre.

Adicione 1550 µl de Buffer AVE* ao tubo que contém 310 µg de RNA carreador liofilizado para obter uma solução de 0,2 µg/µl de concentração. Dissolva completamente o RNA carreador, divida-o em alíquotas no tamanho mais conveniente e armazene-o a -30 °C a -15 °C. Não congele/descongele as alíquotas do RNA carreador repetidas vezes.

Observe que o RNA carreador não se dissolve em Buffer ACL. Ele precisa, primeiro, ser dissolvido no Buffer AVE e, depois, adicionado ao Buffer ACL.

Calcule o volume da mistura do RNA carreador com o Buffer ACL necessário por lote de amostras, de acordo com as tabelas nos protocolos. Selecione o número de amostras a serem processadas simultaneamente.

Misture, com cuidado, invertendo o tubo ou o frasco 10 vezes. Para evitar a formação de espuma, não centrifugue.

*Contém azida de sódio como conservante.

Nota: O procedimento de preparo de amostras é otimizado para um máximo de 1,0 µg de RNA carreador por amostra. Se for demonstrado que menos RNA carreador é melhor para o seu sistema de amplificação, transfira apenas a quantidade necessária de RNA carreador dissolvido para os tubos que contêm Buffer ACL. Para cada micrograma de RNA carreador necessário por preparação, adicione 5 µl de RNA carreador dissolvido ao Buffer ACL. (O uso de menos de 1,0 µg de RNA carreador por amostra pode ser benéfico e deve ser validado para cada tipo específico de amostra e ensaio posterior).

Protocolo Breeze: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano

Este protocolo se destina à purificação de DNA e RNA circulante de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano e foi otimizado para proporcionar um curto tempo de manipulação e resposta. Para fluxos de trabalho validados por usuário existentes e que usam o QIAamp DSP Circulating NA Kit, versão 1/R3, consulte o "Protocolo clássico: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano" (página 34).

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Desligue o vácuo entre as etapas, para garantir que um vácuo consistente e constante seja aplicado durante as etapas do protocolo.
Nota: A pressão da Vacuum Pump deve ser de -800 a -900 mbar.
- Equilibre as amostras à temperatura ambiente.
- Use um PBS para trazer o volume da amostra ao volume exato mais próximo (1 a 5 ml).
- Configure o QIAvac 24 Plus conforme descrito na página 21.
- Aqueça um banho-maria ou um bloco de aquecimento a 56 °C, para uso com tubos de centrífuga de 50 ml na etapa 3.
- Deixe as colunas de centrifugação QIAamp Mini atingirem a temperatura ambiente durante pelo menos 1 hora antes de utilizá-las.
- Certifique-se de que o Buffer ACB, o Buffer ACW1 e o Buffer ACW2 tenham sido preparados (adição de isopropanol ou etanol) de acordo com as instruções na página 26.
- Adicione o RNA carreador reconstituído no Buffer AVE ao Buffer ACL, de acordo com as instruções na Tabela 3.

Tabela 3. Volumes de Buffer ACL e de RNA carreador (dissolvido em Buffer AVE) necessários para o processamento de amostras de plasma sanguíneo humano de 1-5 ml

Configuração para ml de plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Número de amostras	Buffer ACL (ml)					RNA carreador no Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procedimento: Protocolo Breeze

1. Pipete a QIAGEN Proteinase K, o plasma e o Buffer ACL, **nesta ordem**, em um tubo de centrífuga de 50 ml (não fornecido).

Configuração	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Feche a tampa e misture 5 vezes com agitação em vórtex pulsador por 2 segundos.
Certifique-se de que um redemoinho visível se forme no tubo. Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Buffer ACL sejam completamente misturados, para produzir uma solução homogênea.
Nota: Não interrompa o procedimento neste momento. Vá imediatamente para a etapa 3, para iniciar a incubação da lise.
3. Incube a 56 °C (±1 °C) durante 15 (±1) minutos.
4. Coloque o tubo de volta sobre a bancada do laboratório e desenrosque a tampa.
5. Adicione o Buffer ACB ao lisado no tubo. Escolha o volume de acordo com a configuração da etapa 1.

Configuração	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Feche a tampa e misture 5 vezes com agitação em vórtex pulsador por 2 segundos.
Certifique-se de que um redemoinho visível se forme no tubo. Para garantir uma lise eficiente, é essencial que o lisado e o Buffer ACB sejam completamente misturados, para produzir uma solução homogênea.

7. Incube a mistura de Buffer ACB-lisado no tubo durante 5 (\pm 1) minutos em temperatura ambiente.
8. Insira a coluna QIAamp Mini no VacConnector no QIAvac 24 Plus (consulte "Configuração do QIAvac 24 Plus vacuum manifold", página 21). Insira um extensor de coluna de 20 ml na coluna QIAamp Mini aberta.

Certifique-se de que o extensor de coluna esteja firmemente inserido na coluna do QIAamp Mini, para evitar vazamento de amostra.

Nota: Guarde o tubo de lavagem para a centrifugação a seco na etapa 13.

9. Aplique, cuidadosamente, o lisado da etapa 7 no extensor de coluna da coluna QIAamp Mini. Ligue a bomba de vácuo. Quando todos os lisados tiverem sido retirados completamente pelas colunas, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar. Remova, cuidadosamente, e descarte o extensor de coluna.

Observe que volumes grandes de lisados de amostras (aproximadamente 18 ml ao iniciar com uma amostra de 5 ml) podem precisar de até 20 minutos para passar pela membrana do QIAamp Mini por força do vácuo.

Para uma liberação rápida e conveniente do vácuo, deve ser usado o Vacuum Regulator (parte do QIAvac Connecting System).

Nota: Para evitar a contaminação cruzada, tenha cuidado para não cruzar as colunas QIAamp Mini vizinhas enquanto os extensores de coluna são removidos.

10. Aplique 600 μ l de Buffer ACW1 à coluna QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o Buffer ACW1 tiver sido retirado completamente pela coluna QIAamp Mini, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar.
11. Aplique 750 μ l de Buffer ACW2 à coluna QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o Buffer ACW2 tiver sido retirado completamente pela coluna QIAamp Mini, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar.
12. Aplique 750 μ l de etanol (96–100%) à coluna QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o etanol tiver sido retirado completamente pela coluna de centrifugação, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar.

13. Feche a tampa da coluna QIAamp Mini. Remova-a do coletor de vácuo e descarte o VacConnector. Coloque a coluna QIAamp Mini em um tubo de lavagem de 2 ml limpo (da etapa 8) e centrifugue, a toda velocidade (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 3 ($\pm 0,5$) minutos.
14. Coloque a coluna QIAamp Mini em um novo tubo de lavagem de 2 ml. Abra a tampa e incube o conjunto em temperatura ambiente durante 3 minutos para secar a membrana completamente.
15. Coloque a coluna QIAamp Mini em um tubo de eluição de 1,5 ml (fornecido) e descarte o tubo de lavagem de 2 ml da etapa 14. Aplique, cuidadosamente, 20–150 μ l de Buffer AVE no centro da membrana da coluna QIAamp Mini. Feche a tampa e incube a uma temperatura ambiente durante três ($\pm 0,5$) minutos.

Importante: Certifique-se de que o Buffer AVE de eluição seja equilibrado à temperatura ambiente (15 °C–25 °C). Se a eluição for feita em pequenos volumes (<50 μ l), o tampão de eluição terá que ser despejado no centro da membrana, para a eluição completa de ácidos nucleicos ligados.

O volume de eluição é flexível e pode ser adaptado, de acordo com os requisitos de aplicações a jusante.

Eluições com volumes menores de Buffer AVE levam a concentrações mais altas de ácido nucleico mas podem resultar em um rendimento total inferior.

O volume de eluato recuperado poderá ser até 5 μ l menor que o volume de eluição aplicado à membrana da coluna QIAamp Mini.

Nota: Para rendimentos de NA baixos esperados, é recomendável o uso de tubos Low Bind (Ligação reduzida) para a eluição (não fornecidos).

16. Centrifugue em uma microcentrífuga à velocidade total (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 1 minuto, para eluir os ácidos nucleicos.

Nota: Posicione as tampas do tubo de eluição de modo a apontarem em uma direção oposta ao sentido do rotor (por ex., se o rotor girar no sentido horário, oriente as tampas no sentido anti-horário).

Protocolo clássico: Purificação de ácidos nucleicos circulantes de 1–5 ml de plasma sanguíneo humano

Este protocolo representa o protocolo inalterado do *Manual do QIAamp DSP Circulating NA Kit*, Revisão 3 (R3) para uso com, por exemplo, fluxos de trabalho validados pelo usuário existentes para 1 a 5 ml de plasma humano.

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Desligue o vácuo entre as etapas, para garantir que um vácuo consistente e constante seja aplicado durante as etapas do protocolo.
Nota: A pressão da Vacuum Pump deve ser de -800 a -900 mbar.
- Equilibre as amostras à temperatura ambiente.
- Use um PBS para trazer o volume da amostra ao volume exato mais próximo (1 a 5 ml).
- Configure o QIAvac 24 Plus conforme descrito na página 21.
- Aqueça um banho-maria ou um bloco de aquecimento a 60 °C, para uso com tubos de centrífuga de 50 ml na etapa 3.
- Aqueça um bloco de aquecimento a 56 °C, para uso com tubos de lavagem de 2 ml na etapa 14.
- Deixe as colunas de centrifugação do QIAamp Mini atingirem a temperatura ambiente durante pelo menos 1 hora antes de utilizá-las.
- Certifique-se de que o Buffer ACB, o Buffer ACW1 e o Buffer ACW2 tenham sido preparados (adição de isopropanol ou etanol) de acordo com as instruções na página 26.
- Adicione o RNA carreador reconstituído no Buffer AVE ao Buffer ACL, de acordo com as instruções na Tabela 4.

Tabela 4. Volumes de Buffer ACL e de RNA carreador (dissolvido em Buffer AVE) necessários para o processamento de amostras de plasma sanguíneo humano de 1–5 ml

Configuração para ml de plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Número de amostras	Buffer ACL (ml)					RNA carreador no Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procedimento: Protocolo clássico

1. Pipete a QIAGEN Proteinase K, o plasma e o Buffer ACL, nesta ordem, em um tubo de centrífuga de 50 ml (não fornecido).

Configuração	A	B	C	D	E
ProtK (µl)	100	200	300	400	500
Plasma (ml)	1	2	3	4	5
ACL (ml)	0,8	1,6	2,4	3,2	4

2. Feche a tampa e misture por agitação em vórtex pulsador por 30 segundos.

Certifique-se de que um redemoinho visível se forme no tubo. Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Buffer ACL sejam completamente misturadas, para produzir uma solução homogênea.

Nota: Não interrompa o procedimento neste momento. Vá imediatamente para a etapa 3, para iniciar a incubação da lise.

3. Incube a 60 °C (± 1 °C) durante 30 (± 2) minutos.
4. Coloque o tubo de volta sobre a bancada do laboratório e desenrosque a tampa.
5. Adicione o Buffer ACB ao lisado no tubo. Escolha o volume de acordo com a configuração da etapa 1.

Configuração	A	B	C	D	E
ACB (ml)	1,8	3,6	5,4	7,2	9

6. Feche a tampa e misture bem com agitação em vórtex pulsador durante 30 segundos.

Certifique-se de que um redemoinho visível se forme no tubo. Para garantir uma lise eficiente, é essencial que o lisado e o Buffer ACB sejam completamente misturados, para produzir uma solução homogênea.

7. Incube a mistura Buffer ACB-lisado no tubo durante 5 (± 1) minutos no gelo.

8. Insira a coluna QIAamp Mini no VacConnector no QIAvac 24 Plus (consulte "Configuração do QIAvac 24 Plus vacuum manifold", página 21). Insira um extensor de coluna de 20 ml na coluna QIAamp Mini aberta.

Certifique-se de que o extensor de coluna esteja firmemente inserido na coluna do QIAamp Mini, para evitar vazamento de amostra.

Nota: Guarde o tubo de lavagem para a centrifugação a seco na etapa 13.

9. Aplique, cuidadosamente, o lisado da etapa 7 no extensor de coluna da coluna QIAamp Mini. Ligue a bomba de vácuo aplicando uma pressão de -800 a -900 mbar. Quando todos os lisados tiverem sido retirados completamente pelas colunas, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar. Remova, cuidadosamente, e descarte o extensor de coluna.

Observe que volumes grandes de lisados de amostras (aproximadamente 18 ml ao iniciar com uma amostra de 5 ml) podem precisar de até 20 minutos para passar pela membrana do QIAamp Mini por força do vácuo.

Para uma liberação rápida e conveniente do vácuo, deve ser usado o Vacuum Regulator (parte do QIAvac Connecting System).

Nota: Para evitar a contaminação cruzada, tenha cuidado para não cruzar as colunas QIAamp Mini vizinhas enquanto os extensores de coluna são removidos.

10. Aplique 600 µl de Buffer ACW1 à coluna QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o Buffer ACW1 tiver sido retirado completamente pela coluna QIAamp Mini, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar.
11. Aplique 750 µl de Buffer ACW2 à coluna QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o Buffer ACW2 tiver sido retirado completamente pela coluna QIAamp Mini, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar.
12. Aplique 750 µl de etanol (96–100%) à coluna QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o etanol tiver sido retirado completamente pela coluna giratória, desligue a bomba de vácuo e solte a pressão até 0 mbar.

13. Feche a tampa da coluna QIAamp Mini. Remova-a do coletor de vácuo e descarte o VacConnector. Coloque a coluna QIAamp Mini em um tubo de lavagem de 2 ml limpo (da etapa 8) e centrifugue, a toda velocidade (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 3 ($\pm 0,5$) minutos.
14. Coloque a coluna QIAamp Mini em um novo tubo de lavagem de 2 ml. Abra a tampa e incube o conjunto a 56 °C (± 1 °C) durante 10 (± 1) minutos para secar a membrana completamente.
15. Coloque a coluna QIAamp Mini em um tubo de eluição de 1,5 ml (fornecido) e descarte o tubo de lavagem de 2 ml da etapa 13. Aplique, cuidadosamente, 20–150 μ l de Buffer AVE no centro da membrana da coluna QIAamp Mini. Feche a tampa e incube a uma temperatura ambiente durante três ($\pm 0,5$) minutos.

Importante: Certifique-se de que o Buffer AVE de eluição seja equilibrado à temperatura ambiente (15 °C–25 °C). Se a eluição for feita em pequenos volumes (<50 μ l), o tampão de eluição terá que ser despejado no centro da membrana, para a eluição completa de ácidos nucleicos ligados.

O volume de eluição é flexível e pode ser adaptado, de acordo com os requisitos de aplicações a jusante.

Eluições com volumes menores de Buffer AVE levam a concentrações mais altas de ácido nucleico, mas podem resultar em um rendimento total inferior.

O volume de eluato recuperado poderá ser até 5 μ l menor que o volume de eluição aplicado à coluna QIAamp Mini.

Nota: Para rendimentos de NA baixos esperados, é recomendável o uso de tubos Low Bind (Ligação reduzida) para a eluição (não fornecidos).

16. Centrifugue em uma microcentrífuga à velocidade total (20.000 x g; 14.000 rpm) durante 1 minuto, para eluir os ácidos nucleicos.

Nota: Posicione as tampas do tubo de eluição de modo a apontarem em uma direção oposta ao sentido do rotor (por ex., se o rotor girar no sentido horário, oriente as tampas no sentido anti-horário).

Controle de qualidade

De acordo com o sistema de gestão de qualidade com certificado ISO da QIAGEN, cada lote de kits QIAamp DSP Circulating NA é testado com relação a especificações pré-determinadas, para garantir a qualidade consistente do produto.

Limitações

O desempenho do sistema em relação ao isolamento de ácidos nucleicos circulantes e livre de células foi estabelecido usando amostras de plasma humano geradas a partir dos seguintes tubos de coleta de sangue:

- K2-EDTA (Becton Dickinson and Company, n° de ref. 367525)
- PAXgene® Blood ccfDNA Tube (PreAnalytiX, n° de ref. 768115)
- Cell-Free DNA BCT (Streck, n° de ref. 218962)

É responsabilidade do usuário validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, deve-se utilizar os controles adequados para aplicações a jusante. Para validação adicional, as diretrizes da Conferência Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos (ICH) em ICH Q2 (R1) Validação de Procedimentos Analíticos: Teste e metodologia são recomendados.

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

Características de desempenho

As características de desempenho aplicável estão disponíveis na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com.

Referências

1. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
2. Levy, B. (2019) *Prenatal Diagnosis. Methods in Molecular Biology*. 2nd ed. New York: Humana Press.
3. Hahn, S. and Zimmermann, B.G. (2010) Cell-free DNA in maternal plasma: has the size-distribution puzzle been solved? *Clin Chem*. **56**, 1210-1211.
4. Anfossi, S., Babayan, A., Pantel, K., and Calin, G. (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541-563.
5. Babayan, A. and Pantel, K. (2018) Advances in liquid biopsy approaches for early detection and monitoring of cancer. *Genome Med* **10**, 21.
6. Terrinoni, A., et al (2019) The circulating miRNAs as diagnostic and prognostic markers. *Clin Chem Lab Med*. **57**, 932-953.

Guia de solução de problemas

Este guia de solução de problemas pode ser útil para resolver qualquer problema que possa surgir. Para obter mais informações, consulte também a página de perguntas frequentes (Frequently Asked Questions, FAQ) no nosso Centro de Suporte Técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Os cientistas da Assistência Técnica da QIAGEN estão sempre prontos a responder quaisquer perguntas que você possa ter sobre as informações e/ou os protocolos neste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contato, acesse www.qiagen.com).

Comentários e sugestões

Pouco ou nenhum ácido nucleico no eluído

- | | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) Uso de plasma não estabilizado | Amostras de plasma não estabilizado podem levar à degradação acelerada de DNA. Recomendamos que a CEN/TS 16835-3:2015 seja seguida. Repita o procedimento de purificação com novas amostras. |
| b) Tempo prolongado entre a retirada do sangue e a preparação do plasma | As células sanguíneas nucleadas podem se desintegrar e liberar DNA genômico no plasma, diluindo o ácido nucleico-alvo. |
| c) Amostras congeladas e descongeladas mais de uma vez | Congelamento e descongelamento repetido deve ser evitado, pois pode levar a degradação do DNA. Use sempre as amostras frescas ou amostras descongeladas apenas uma vez. |
| d) Baixa concentração de DNA-alvo nas amostras | As amostras de plasma foram deixadas em temperatura ambiente por muito tempo. Repita o procedimento de purificação com novas amostras
Nota: Alguns indivíduos podem ter uma baixa concentração de NA livre de células no plasma; neste caso, deve ser escolhido um volume de amostra maior e um volume de eluato baixo. |
| e) Lise de amostra ineficiente no Buffer ACL | Se a QIAGEN Proteinase K tiver sido submetida a temperatura elevada durante tempo prolongado, ela poderá perder a atividade. Repita o procedimento usando novas amostras e a QIAGEN Proteinase K fresca. |
| f) A mistura de Buffer ACL e RNA carreador não foi misturada suficientemente | Misture o Buffer ACL com o RNA carreador invertendo, com cuidado, o tubo de Buffer ACL-RNA carreador pelo menos 10 vezes. |
| g) Etanol de baixa porcentagem usado, em vez de etanol entre 96–100% | Repita o procedimento de purificação com novas amostras e etanol entre 96–100%. Não use álcool desnaturado, que contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona. |
| h) Buffer ACB preparado incorretamente | Verifique se o concentrado de Buffer ACB foi reconstituído com o volume correto de isopropanol (não etanol, consulte a página 26). |

Comentários e sugestões

- | | | |
|----|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| i) | Buffer ACW1 ou Buffer ACW2 preparado incorretamente | Verifique se os concentrados de Buffer ACW1 e Buffer ACW2 foram diluídos com o volume correto de etanol (consulte a página 26). Repita o procedimento de purificação com novas amostras. |
| j) | Buffer ACW1 ou Buffer ACW2 preparados com etanol 70% | Verifique se os concentrados de Buffer ACW1 e Buffer ACW2 foram diluídos com etanol entre 96–100% (consulte a página 26). Repita o procedimento de purificação com novas amostras. |

O DNA ou RNA não têm bom desempenho nas reações enzimáticas descendentes.

- | | | |
|----|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) | Pouco ou nenhum DNA no eluato | Consulte "Pouco ou nenhum ácido nucleico no eluído" acima para obter os motivos possíveis. Aumente a quantidade de eluído adicionado à reação se possível. |
| b) | Volume de eluição inadequado usado | Determine o volume máximo de eluato adequado para sua aplicação a jusante. Reduza ou aumente o volume de eluato adicionado à aplicação a jusante adequadamente. O volume de eluição pode ser adaptado proporcionalmente.
Nota: Eluições com volumes menores de Buffer AVE levam a concentrações mais altas de ácido nucleico mas podem resultar em um rendimento total inferior. |
| c) | Tampões não misturados completamente | Os componentes sal e etanol do Buffer ACW2 de lavagem podem ter se separado, depois de serem deixados parados por um longo período entre execuções. Sempre misture as soluções tampão completamente, antes de cada execução. |
| d) | Interferência devido ao RNA carreador | Se a presença do RNA carreador no eluído interferir na reação enzimática a jusante, poderá ser necessário reduzir a quantidade de RNA carreador ou omitir essa quantidade completamente. |

Manuseio geral












- | | | |
|----|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a) | Coluna QIAamp Mini entupida | Se a vazão for reduzida, o tempo de vácuo poderá ser prolongado.
Em alternativa, feche a VacValve, se usada, e remova, com cuidado, o conjunto extensor de coluna-VacConnector-VacValve da coluna QIAamp Mini, sem perder nenhum dos lisados no extensor de coluna.
Remova a coluna QIAamp Mini do coletor de vácuo, coloque-a em um tubo de lavagem de 2 ml e gire-o a toda velocidade, até que a amostra tenha passado completamente pela membrana. Substitua o conjunto extensor-VacConnector-VacValve que contém o lisado remanescente. Ligue a bomba de vácuo, abra a VacValve e continue a carregar o lisado remanescente.
Repita o procedimento acima, se a coluna QIAamp Mini continuar a entupir.
Crioprecipitados podem ter se formado no plasma, devido a congelamento e descongelamento repetido. Eles podem bloquear a coluna QIAamp Mini. Não use plasma que tenha sido congelado e descongelado mais de uma vez. |
|----|-----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Comentários e sugestões

- No caso de os crioprecipitados serem visíveis, limpe a amostra com centrifugação durante 5 minutos a 16.000 x g.
- b) Volumes de eluição variáveis Amostras diferentes podem afetar o volume do eluído final. O volume de eluato recuperado poderá ser até 5 µl menor que o volume de eluição aplicado à coluna QIAamp Mini.
- c) Pressão de vácuo de -800 a -900 mbar não atingida O coletor de vácuo não está bem fechado. Pressione para baixo a tampa do coletor de vácuo, depois de o vácuo ter sido ligado. Verifique se a pressão de vácuo é atingida.
- A gaxeta da tampa do QIAvac está desgastada. Verifique, visualmente, a vedação do coletor e substitua, se necessário.
- As VacValves se desgastaram. Remova todas as VacValves e insira VacConnectors diretamente nas extensões luer. Insira as colunas QIAamp Mini nos VacConnectors, feche a tampa das colunas e ligue o vácuo. Verifique se a pressão de vácuo é atingida. Substitua as VacValves, se necessário.
- A conexão com a bomba de vácuo está vazando. Feche toda a extensão luer com tampas luer e ligue a bomba de vácuo. Verifique se a pressão do vácuo está estável, depois de a bomba ter sido ligada (e a válvula do Vacuum Regulator está fechada). Troque as conexões entre a bomba e o coletor do aspirador, se necessário.
- Se a pressão de vácuo ainda não tiver sido atingida, substitua a bomba de vácuo por uma mais forte.

Símbolos

Os seguintes símbolos são exibidos nas instruções de uso ou na embalagem e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
 Σ <N>	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
	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
	Número de lote
	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
	Componentes
	Contém
	Número
	Número global de item comercial

Símbolo

Definição do símbolo

Rn	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consulte as instruções de uso
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Aviso/cuidado
	Na chegada
	Abra na entrega. Armazene as colunas de centrifugação QIAamp Mini entre 2–8 °C
	Volume
	Adição

Símbolo

Definição do símbolo



Anote a data atual, depois da adição de etanol no frasco

EtOH

Etanol



Anote a data atual, depois da adição de isopropanol no frasco

IPA

Isopropanol

→

Resulta em

GITC

Tiocianato de guanidina

GuHCl

Cloridrato de guanidina

BRIJ 58

BRIJ 58

PROTK

Proteinase K

UDI

Identificador único do dispositivo

Anexo A: Recomendação para separação e armazenamento do plasma sanguíneo

Para tubos de coleta de sangue de estabilização (por ex., PAXgene ccfDNA Tube ou Streck Cell-Free DNA Tube), siga as instruções do fabricante quando à separação e ao armazenamento de plasma. Recomendamos a validação dessas condições de armazenamento em combinação com sua aplicação a jusante e alvo específicos.

Para BCT não estabilizado, recomendamos seguir a norma ISO 20186-3:2019 de Exames de diagnóstico in vitro moleculares – Especificações para processos de exames prévios de sangue venoso total – parte 3: DNA isolado de células circulantes livres de plasma ou CEN/TS 17742 de Exames de diagnóstico in vitro moleculares – Especificações para processos de exames prévios de sangue venoso total – RNA isolado de células circulantes livres de plasma.

Para isolar os ácidos nucleicos circulantes livres de células de amostras de sangue, recomendamos seguir este protocolo, que inclui uma etapa de centrifugação de força g alta, para remover detritos celulares, reduzindo, assim, a quantidade de DNA e RNA celulares ou genômicos na amostra.

1. Coloque todo o sangue com EDTA nos tubos BD Vacutainer® (ou outros tubos de sangue principais que contiverem EDTA como anticoagulante) em uma centrífuga resfriada a 4 °C com rotor que se move horizontalmente em recipientes adequados.
2. Centrifugue as amostras de sangue durante 10 minutos 1900 x g (3000 rpm) a 4 °C.
3. Aspire, com cuidado, o sobrenadante do plasma, sem perturbar a camada de interface plasma-celular. Aproximadamente 4 a 5 ml de plasma pode ser obtido de um tubo de sangue principal de 10 ml.

Nota: O plasma pode ser usado para a extração de ácido nucleico circulante nesse estágio. No entanto, a seguinte centrifugação de alta velocidade removerá detritos celulares adicionais e a contaminação dos ácidos nucleicos circulantes por DNA e RNA genômicos gerados das células sanguíneas nucleadas danificadas.

4. O plasma aspirado é transferido para um tubo de centrífuga novo.
5. Centrifugue as amostras de plasma durante 10 minutos $16.000 \times g$ (em rotor de ângulo fixo) a 4°C .

Isso removerá ácidos nucleicos celulares adicionais conectados aos detritos de células.

6. Remova cuidadosamente o sobrenadante e transfira para um novo tubo sem perturbar o pellet.
7. Se o plasma for usado para a extração de ácido nucleico no mesmo dia, armazene entre 2 a 8°C , até que haja mais processamento. Para armazenamentos de maior duração, é possível armazenar alíquotas de plasma de tubos de coleta de sangue estabilizado e não estabilizado a -20°C (DNA como alvo) ou -80°C (RNA como alvo) por pelo menos 4 semanas. Antes de usar o plasma para a extração de ácido nucleico circulante, descongele os tubos de plasma em temperatura ambiente.
8. **Opcional:** Para remover crioprecipitados, centrifugue as amostras de plasma durante 5 minutos $16.000 \times g$ (em rotor de ângulo fixo).

Opcional: Transfira o sobrenadante para um novo tubo e, em seguida, comece com o protocolo de extração de ácido nucleico circulante.

Anexo B: Observações gerais sobre o manuseio de RNA

Manuseio de RNA

As ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e ativas que, geralmente, não precisam de cofatores para funcionar. Como as RNases são difíceis de desativar e cada mínima quantidade é suficiente para destruir o RNA, não use utensílios de plástico ou de vidro sem, primeiro, eliminar possível contaminação por RNase. Muito cuidado deve ser tomado, para evitar introduzir, sem querer, RNases na amostra de RNA durante ou depois do procedimento de purificação. Para criar e manter um ambiente sem RNase, as seguintes precauções deverão ser tomadas durante o pré-tratamento e o uso de vasos e soluções descartáveis e não descartáveis ao trabalhar com RNA.

Manuseio geral

Use sempre uma técnica asséptica e microbiológica adequada ao trabalhar com RNA. Partículas das mãos e de pó podem carregar bactérias e mofo e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Sempre use luvas de látex ou vinil durante o manuseio de reagentes e amostras de RNA, para evitar contaminações por RNase com origem na superfície da pele ou em poeira do equipamento de laboratório. Troque as luvas com frequência e mantenha os tubos fechados, sempre que possível. Mantenha o RNA purificado no gelo, quando as partes dele forem pipetadas para aplicações descendentes.

Utensílios de plástico descartáveis

É recomendado o uso de tubos de polipropileno estéreis, livres de RNase e descartáveis durante o procedimento.

Informações sobre pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Para 50 preparações: Colunas QIAamp Mini, extensores de coluna, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagentes, soluções tampão e tubos de coleta	61504
Acessórios		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Coletor de vácuo para processamento de 1–24 colunas de centrifugação: QIAvac 24 Plus vacuum manifold, plugues luer, acoplamentos rápidos	19413
Vacuum Pump*	Bomba de vácuo universal	84010 [EUA e Canadá] 84000 [Japão] 84020 [resto do mundo]
QIAvac Connecting System*	Sistema para conectar o coletor de vácuo com a bomba de vácuo: inclui bandeja, frascos de resíduos, acoplamentos, válvulas, medidor e 24 VacValves.	19419

* Para uso com protocolos de vácuo.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do kit QIAGEN correspondente. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R1, junho de 2022	Lançamento do Kit IVDR Versão 2, sem alterações nos protocolos ou dados de desempenho em comparação ao Kit Versão 1; adição de isolamento "manual" no uso pretendido; pequenas atualizações e correções

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Esta página foi deixada em branco intencionalmente

Acordo de licença limitada para o QIAamp DSP Circulating NA Kit

O uso deste produto implica a aceitação, por parte de qualquer comprador ou usuário do produto, dos seguintes termos:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo ao uso exclusivo de componentes contidos no painel. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incorporar os componentes deste painel com quaisquer componentes não incluídos nele, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infringem os direitos de terceiros.
2. Com exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este painel e/ou o seu uso não infrinja os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN renuncia especificamente a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, à exceção das expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá fazer cumprir as proibições deste Contrato de Licença Limitada em qualquer Tribunal e recuperará todos os seus custos de investigação e de Tribunal, incluindo honorários de advogados, em qualquer ação destinada a fazer cumprir este Contrato de Licença Limitada ou qualquer um de seus direitos de propriedade intelectual relativos ao painel e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, consulte o site www.qiagen.com.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); PAXgene® (PreAnalytix GmbH); Tween™ (ICI Americas Inc.). Os nomes registrados, marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, não devem ser considerados como não protegidos pela lei.

Junho de 2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN, todos os direitos reservados.

