

Folha de protocolo do QIAAsymphony SP

Protocolo DNA_Buffy_Coat_400_V6_DSP

Informações gerais

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Este protocolo destina-se à purificação de ADN total genómico e mitocondrial da camada leuco-plaquetária (buffy coat), recém-colhida ou congelada, utilizando o QIAAsymphony® SP e o QIAAsymphony DSP DNA Midi Kit.

Kit	QIAAsymphony DSP DNA Midi Kit (cat. n.º 937255)
Material para amostra	Camada leuco-plaquetária (buffy coat) (coagulada com EDTA, citrato ou heparina)
Nome do protocolo	DNA_BC_400_V6_DSP
Conjunto de controlo do ensaio predefinido	ACS_BC_400_V6_DSP
Editável	Volume de eluição: 200 µl, 400 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0

Setembro 2012



Sample & Assay Technologies

Bandeja "Sample" (amostra)

Tipo de amostra	Camada leuco-plaquetária (buffy coat) (coagulada com EDTA, citrato ou heparina)
Volume da amostra	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado; para obter mais informações, consultar www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Tubos de amostras primários	n/a
Tubos de amostras secundários	Para obter mais informações, consultar www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Introdutores	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado; para obter mais informações, consultar www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

n/a = não aplicável.

Bandeja "Reagents and Consumables" (reagentes e consumíveis)

Posição A1 e/ou A2	Cartucho de reagentes
Posição B1	n/a
Suporte de pontas 1-17	Pontas com filtro descartáveis, 200 µl ou 1500 µl
Suporte de caixa de unidades 1-4	Caixas de unidades contendo cartuchos de preparação de amostras ou mangas de 8 barras

n/a = não aplicável.

Bandeja "Waste" (resíduos)

Suporte de caixa de unidades 1-4	Caixas de unidades vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte do frasco de resíduos líquidos	Frasco de resíduos líquidos vazio

Bandeja “Eluate” (eluato)

**Suporte de eluição
(recomendamos a
utilização da ranhura 1,
posição de arrefecimento)**

Para obter mais informações, consultar
www.qiagen.com/goto/dsphandbooks.

Material de plástico necessário

	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 72 amostras*	Quatro lotes, 96 amostras*
Pontas com filtro descartáveis, 200 µl^{†‡}	4	4	4	8
Pontas com filtro descartáveis, 1500 µl^{†‡}	110	212	314	424
Cartuchos de preparação de amostras[§]	18	36	54	72
Mangas de 8 barras[¶]	3	6	9	12

* A utilização de menos do que 24 amostras por lote diminui o número de pontas com filtro descartáveis necessárias para o ensaio.

† Estão disponíveis suportes de 32 pontas/pontas com filtro.

‡ O número de pontas com filtro necessárias inclui pontas com filtro para 1 inventariação por cartucho de reagente.

§ Estão disponíveis 28 cartuchos de preparação de amostras/caixa de unidades.

¶ Estão disponíveis doze mangas de 8 barras/caixa de unidades.

Nota: O número de pontas com filtros fornecidas pode diferir dos números visualizados no ecrã tátil, dependendo das definições. Recomendamos o carregamento do número máximo possível de pontas.

Volume de eluição

O volume de eluição é seleccionado no ecrã táctil. Dependendo do tipo de amostra e conteúdo de ADN, o volume de eluição final poderá variar até 15 μl menos do que o volume seleccionado. Devido a esta possível variação, o volume de eluição real deve ser verificado quando é utilizado um sistema de configuração do ensaio automatizado que não verifica o volume de eluição previamente à transferência. A eluição em volumes menores aumenta a concentração de ADN final, embora reduza o rendimento. Recomendamos a utilização de um volume de eluição adequado para a aplicação downstream pretendida.

Preparação do material de amostra

Ao trabalhar com produtos químicos, usar sempre equipamento de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (MSDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

Ponto importante antes de iniciar

- As partículas magnéticas do QIASymphony podem copurificar o ARN, caso esteja presente na amostra. Para minimizar o conteúdo de ARN na amostra, adicionar RNase A à mesma antes de iniciar o procedimento. A concentração final de RNase A deverá ser de 2 mg/ml.

Camada leuco-plaquetária (buffy coat)

Buffy coat é uma fracção de sangue total enriquecida com leucócitos. A eficiência do enriquecimento leucocitário depende do procedimento utilizado para preparar a camada leuco-plaquetária (buffy coat) e da precisão com que esta camada é extraída. Preparar a camada leuco-plaquetária, centrifugando amostras de sangue total contendo um anticoagulante padrão (EDTA, citrato ou heparina) a 900–1100 x g durante 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C). Após a centrifugação, são distinguíveis 3 fracções diferentes: a camada superior transparente é plasma; a camada intermédia é leuco-plaquetária (buffy coat) e contém uma concentração de leucócitos; e a camada inferior contém uma concentração de eritrócitos. Deve ser colhida uma fracção com aproximadamente 1 ml de leucócitos de 10 ml de sangue total centrifugado, a qual, em média, fornecerá um enriquecimento de 5–6x. Por exemplo, 10 ml de sangue total com uma contagem de glóbulos brancos de 6×10^6 células/ml resulta numa camada leuco-plaquetária (buffy coat) de 1 ml. Assumindo um enriquecimento de 5x de glóbulos brancos, isto resulta em 3×10^7 células/ml. Por consequência, num protocolo que utilize uma camada leuco-plaquetária (buffy coat) de 400 μl , serão utilizadas $1,2 \times 10^7$ células.

Para evitar sobrecarregar o procedimento de purificação de ADN; não preparar amostras de camadas leuco-plaquetárias (buffy coat) com enriquecimento >10x. Se as amostras de camadas leuco-plaquetárias (buffy coat) apresentarem um enriquecimento >10x, diluir as amostras para um enriquecimento de 10x ou menos em PBS ou utilizar menos material inicial no procedimento de purificação de ADN.

As amostras de camadas leuco-plaquetárias (buffy coat) podem ser utilizadas imediatamente ou armazenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para purificação de ADN numa data posterior. As amostras congeladas podem ser descongeladas rapidamente em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ com agitação moderada para assegurar uma mistura adequada e depois equilibradas até à temperatura ambiente ($15\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$) antes de iniciar o procedimento. Para assegurar uma transferência de amostra fiável, evitar a formação de espuma nos tubos de amostra. Tentar evitar coágulos de sangue nas amostras e, se necessário, transferir a amostra sem coágulos para um tubo limpo.

Para informações actualizadas sobre licenciamento e limitações de responsabilidade específicas do produto, consultar o respectivo manual do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser pedidos à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas registadas: QIAGEN®, QIASymphony® (QIAGEN Group). Nomes registados, marcas comerciais, etc. utilizados neste documento, quando não assinalados como tal, não devem ser considerados como não protegidos por Lei.

© 2012 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

www.qiagen.com

Australia ■ 1-800-243-800

Austria ■ 0800/281010

Belgium ■ 0800-79612

Canada ■ 800-572-9613

China ■ 021-51345678

Denmark ■ 80-885945

Finland ■ 0800-914416

France ■ 01-60-920-930

Germany ■ 02103-29-12000

Hong Kong ■ 800 933 965

Ireland ■ 1800 555 049

Italy ■ 800 787980

Japan ■ 03-5547-0811

Korea (South) ■ 1544 7145

Luxembourg ■ 8002 2076

The Netherlands ■ 0800 0229592

Norway ■ 800-18859

Singapore ■ 65-67775366

Spain ■ 91-630-7050

Sweden ■ 020-790282

Switzerland ■ 055-254-22-11

UK ■ 01293-422-911

USA ■ 800-426-8157



Sample & Assay Technologies