

Fevereiro de 2023

# PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit (Manual) Instruções de utilização



Versão 3 (V3)

IVD

Para utilização em diagnóstico in vitro



REF

762174



PreAnalytiX<sup>®</sup> GmbH  
Garstligweg 8, 8634 Hombrechtikon, Suíça

Produzido por QIAGEN<sup>®</sup> GmbH para PreAnalytiX GmbH

EC

REP

QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R2

MAT

1130774PT

Marcas comerciais: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH)  
QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube® (Grupo QIAGEN)  
BD™, BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton Dickinson and Company).  
Eppendorf® (Eppendorf AG)

PreAnalytiX GmbH, 8634 Hombrechtikon, CH.

© 2023 PreAnalytiX GmbH. Salvo indicação em contrário, PreAnalytiX, o logótipo do PreAnalytiX e todas as outras marcas comerciais são propriedade da PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, CH.

### **Acordo de licença limitada para o PAXgene Blood RNA Kit**

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva dos componentes contidos no kit. No termos dos direitos de propriedade intelectual, a PreAnalytiX® não concede nenhuma licença para utilizar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) e [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a PreAnalytiX não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringem os direitos de terceiros.
3. Este kit está licenciado para uma única utilização e não pode ser reutilizado, recondicionado ou objeto de revenda.
4. A PreAnalytiX recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos.
6. A PreAnalytiX pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de licença limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todos os custos legais e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de licença limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) e [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

HB-3009-002 BD-8945 1130774PT © 2023 PreAnalytiX GmbH, todos os direitos reservados.

## **Distribuidores de PreAnalytiX**

Os produtos PreAnalytiX são fabricados e distribuídos pela QIAGEN e BD para a PreAnalytiX.

# Conteúdo

Conteúdo .....	3
Utilização prevista.....	6
Utilizador previsto .....	6
Descrição e princípio .....	7
Introdução .....	7
Princípio e procedimento .....	7
Colheita e estabilização da amostra .....	8
Isolamento de ARN.....	8
Isolamento manual de ARN.....	9
Isolamento automatizado de ARN.....	11
Materiais fornecidos.....	14
Conteúdo do kit.....	14
Componentes do kit .....	15
Materiais necessários, mas não fornecidos.....	16
Para todos os protocolos.....	16
Para o protocolo manual.....	17
Para o protocolo automatizado.....	17
Avisos e precauções.....	19
Informações de segurança .....	19
Informações para casos de emergência .....	19
Precauções.....	20
Armazenamento e manuseamento de reagentes .....	23

Estabilidade na utilização .....	23
Colheita, armazenamento e manuseamento de espécimes .....	24
Protocolo: Isolamento manual do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes .....	25
Protocolo: Isolamento automatizado do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) .....	33
Limitações de utilização do produto .....	41
Controlo de qualidade .....	41
Características de desempenho .....	42
Colheita e estabilização da amostra .....	42
Isolamento manual de ARN .....	47
Isolamento automatizado de ARN .....	56
Estabilidade do ARN isolado .....	59
Notas importantes .....	60
Utilizar o QIAcube Connect MDx .....	60
Iniciar o QIAcube Connect MDx .....	60
Instalar protocolos no QIAcube Connect MDx .....	62
Carregar o QIAcube Connect MDx .....	63
Colunas de rotação (PSC, PRC), MCT e material de plástico do QIAcube Connect MDx .....	66
Eliminação .....	72
Referências.....	73
Guia de resolução de problemas .....	74
Símbolos .....	76
Informações de contacto.....	78

Apêndice A: Observações genéricas sobre a manipulação do ARN .....	79
Apêndice B: Quantificação e determinação da qualidade do ARN total .....	80
Apêndice C: Manipulação dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) .....	82
Informações para encomendas .....	84
Histórico de revisões do documento .....	86

# Utilização prevista

Para utilização em diagnóstico in vitro.

O PAXgene Blood RNA System é composto por um tubo de colheita de sangue (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) e um kit de purificação de ácidos nucleicos (PAXgene Blood RNA Kit). O sistema destina-se à colheita, armazenamento e transporte de amostras de sangue e estabilização de ARN intracelular num tubo de amostra fechado, assim como ao isolamento e purificação subsequentes de ARN hospedeiro de sangue total para RT-PCR utilizado em testes de diagnóstico molecular.

As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System apenas foram estabelecidas com as transcrições dos genes FOS e IL1B. O utilizador é responsável por estabelecer características de desempenho adequadas do PAXgene Blood RNA System para outras transcrições-alvo.

## Indicações de utilização

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação de ARN intracelular de sangue total humano colhido no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Quando o kit é utilizado em conjunto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sistema fornece ARN intracelular purificado de sangue total para a RT-PCR utilizada em testes de diagnóstico molecular.

# Utilizador previsto

O produto destina-se a utilizadores profissionais, tais como técnicos e médicos com formação em procedimentos de diagnóstico in vitro.

Este kit destina-se a utilização profissional.

# Descrição e princípio

## Introdução

A colheita de sangue total constitui o primeiro passo em muitos ensaios moleculares utilizados para estudar o ARN celular. No entanto, um importante problema nestas experiências consiste na instabilidade do perfil do ARN celular *in vitro*. Os estudos efetuados pela PreAnalytiX mostraram que o número de cópias das espécies individuais de mRNA em sangue total se pode alterar mais de 1000 vezes durante o armazenamento ou transporte à temperatura ambiente (Rainen et al., 2002). Tal é provocado pela rápida degradação do ARN e pela expressão induzida de alguns genes depois da colheita do sangue. Estas alterações do perfil do ARN tornam impossível a realização de estudos fiáveis da expressão génica. Por conseguinte, torna-se essencial um método que conserve o perfil de expressão do ARN durante e depois da flebotomia para permitir uma análise rigorosa da expressão génica no sangue total humano.

## Princípio e procedimento

A PreAnalytiX desenvolveu um sistema que permite a colheita, estabilização, armazenamento e transporte de amostras de sangue total humano com um protocolo rápido e eficiente para o isolamento de ARN intracelular. O sistema requer a utilização dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) para a colheita de sangue e estabilização de ARN, seguido pelo isolamento manual ou automatizado de ARN utilizando o PAXgene Blood RNA Kit. Os protocolos manual e automatizado proporcionam um desempenho substancialmente equivalente no que se refere à qualidade e rendimento de ARN. Neste manual, estão incluídos dados de desempenho para o protocolo manual (começando na página 47) e o protocolo automatizado (começando na página 56).

O PAXgene Blood RNA System permite a padronização dos passos do fluxo de trabalho pré-analítico, desde a colheita de amostras de sangue até ao isolamento do ARN celular, de acordo com a norma ISO 20186-1:2019, Exames de diagnóstico in vitro moleculares – Especificações para processos de pré-exame para sangue total venoso – Parte 1: ARN celular isolado.

## Colheita e estabilização da amostra

Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contêm um reagente de estabilização de ARN patenteado. Este aditivo protege as moléculas de ARN da degradação por RNases e reduz as modificações ex-vivo da expressão génica ao mínimo. As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System apenas foram estabelecidas com as transcrições dos genes FOS e IL1B, que podem ser visualizadas começando na página 42.

## Isolamento de ARN

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se ao isolamento do ARN total de 2,5 ml de sangue total humano colhido num PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O procedimento é simples e pode ser efetuado utilizando um procedimento manual ou automatizado (consulte a Figura 1 ou a Figura 3, página 10 ou 12, respetivamente). Nos dois protocolos, o isolamento inicia-se com um passo de centrifugação para formar um pellet de ácidos nucleicos no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O pellet é lavado e ressuspenso, seguido por isolamento manual ou automatizado do ARN. Em princípio, os dois protocolos seguem os mesmos passos de protocolo, com os mesmos componentes do kit.



## Isolamento manual de ARN

Em pormenor, o pellet ressuspensão é incubado em tampões otimizados, juntamente com proteinase K (PK), para provocar a digestão de proteínas. É efetuada uma centrifugação adicional através da coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC) para homogeneizar o lisado de células e remover detritos celulares residuais. O sobrenadante da fração do produto residual é transferido para um tubo de microcentrifugação (MCT) limpo. Adiciona-se etanol para otimizar as condições de ligação, e o lisado é aplicado numa coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Durante uma curta centrifugação, o ARN liga-se, de forma seletiva, à membrana de gel de sílica PAXgene, à medida que os contaminantes a atravessam. Os contaminantes restantes são removidos em vários passos de lavagem eficiente. Entre o primeiro e segundo passo de lavagem, a membrana é tratada com DNase I (RNFD) para remover vestígios de ADN ligado. Depois dos passos de lavagem, o ARN é eluído em tampão de eluição (BR5) e desnaturado por calor. As características de desempenho do isolamento manual do ARN utilizando o PAXgene Blood RNA System podem ser visualizadas na página 47.

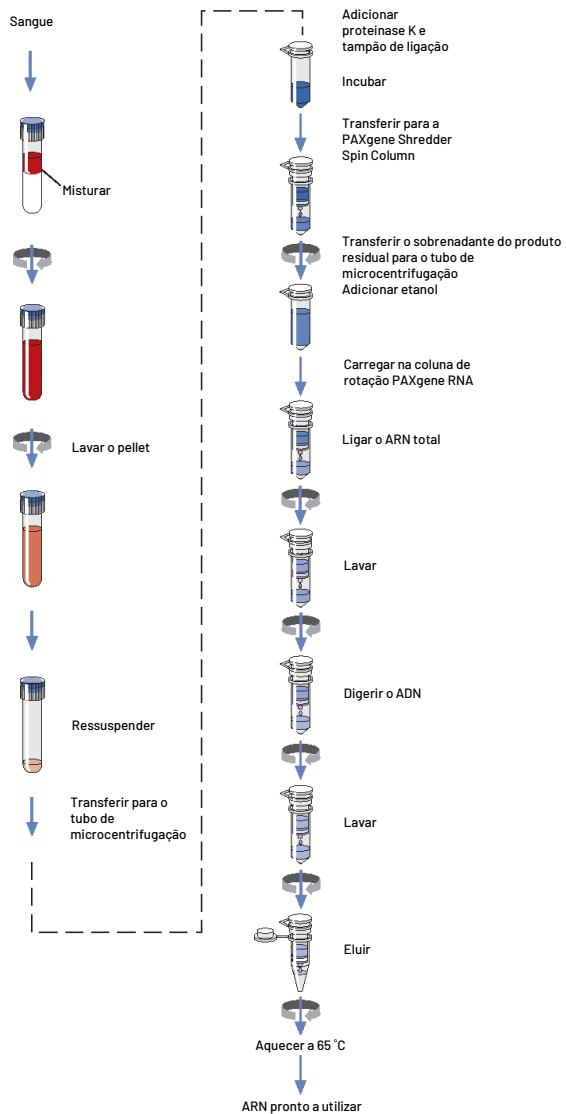


Figura 1: O procedimento manual do PAXgene Blood RNA.

## Isolamento automatizado de ARN

O isolamento de ARN do sangue é automatizado no QIAGEN QIAcube Connect MDx. O equipamento inovador utiliza tecnologia avançada para processar colunas de rotação da QIAGEN, permitindo uma integração perfeita da preparação automatizada de amostras de baixo rendimento no fluxo de trabalho laboratorial. A preparação da amostra utilizando o QIAcube Connect MDx segue os mesmos passos que o procedimento manual (ou seja, lise, ligação, lavagem e eluição) e pode ser efetuada utilizando o mesmo PAXgene Blood RNA Kit.



Figura 2: QIAcube Connect MDx.



O QIAcube Connect MDx da QIAGEN não está disponível em todos os países. Para obter mais detalhes, consulte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

O protocolo de isolamento automatizado de ARN é constituído por duas partes (ou protocolos), "PAXgene Blood RNA Part A" (do sangue no PAXgene Blood RNA Tube para eluir) e "PAXgene Blood RNA Part B" (após eluição com ARN pronto a utilizar), com uma curta intervenção manual entre as duas partes (consulte a Figura 3).

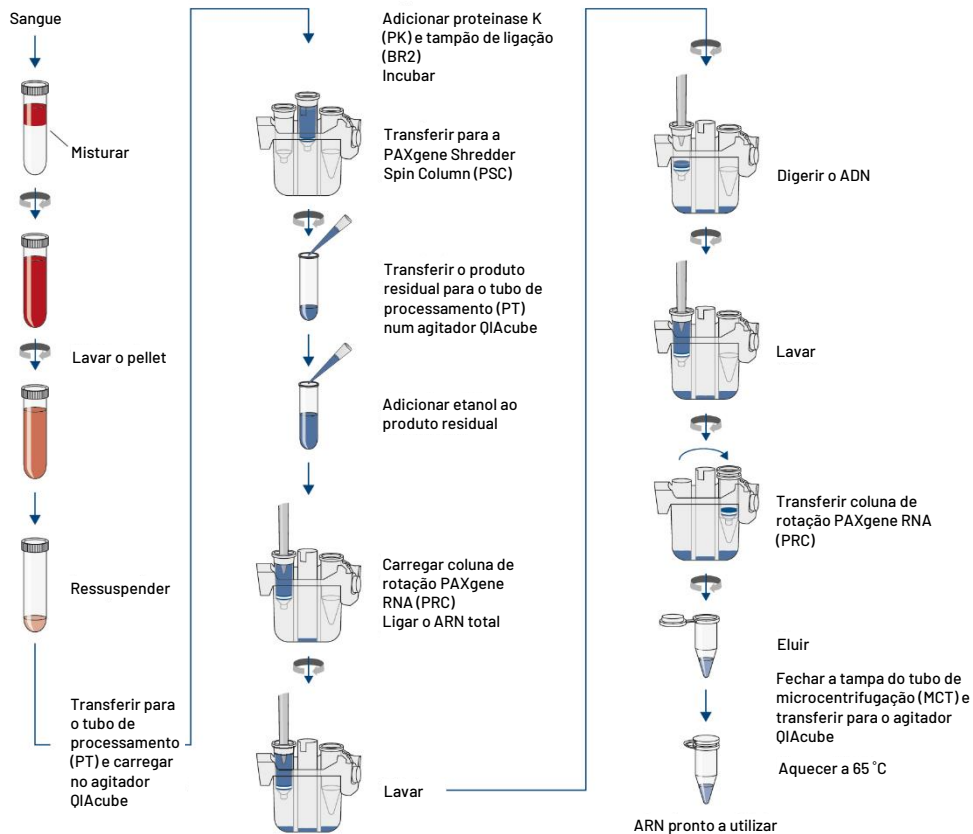


Figura 3: O procedimento automatizado do PAXgene Blood RNA.

O pellet de ácidos nucleicos centrifugado, lavado e ressuspenso (consulte "Isolamento de ARN", página 8) é transferido do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para tubos de processamento (PT), que são colocados na unidade termoagitadora na mesa de trabalho do QIAcube Connect MDx. O técnico seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" a partir do menu. O QIAcube Connect MDx efetua os passos do protocolo até à eluição do ARN em tampão de eluição (BR5). O técnico transfere os MCT que contêm o ARN purificado para a unidade termoagitadora do QIAcube Connect MDx. O técnico seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA Part B" a partir do menu e a desnaturação por calor é efetuada pelo QIAcube Connect MDx. As características de desempenho do isolamento automatizado de ARN utilizando o PAXgene Blood RNA System no QIAcube Connect MDx podem ser visualizados na página 56.

# Materiais fornecidos

## Conteúdo do kit

PAXgene Blood RNA Kit			(50)
N.º de catálogo			762174
Número de dispositivos de colheita			50
Nome do componente	Descrição	Símbolo	Quantidade
BR1	Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)	<b>RES   BUF</b>	20 ml
BR2	Binding Buffer (Tampão de ligação)*	<b>BIND   BUF</b>	18 ml
BR3	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1)*	<b>WASH   BUF   1</b>	45 ml
BR4	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 2) (concentrado) <sup>†</sup>	<b>WASH   BUF   2   CONC</b>	11 ml
BR5	Elution Buffer (Tampão de eluição)	<b>ELU   BUF</b>	6 ml
RNFW	RNase-Free Water (Água livre de RNase) (frasco)	<b>PEL   WASH</b>	2 × 125 ml
PK	Proteinase K (tampa verde)	<b>PROTK</b>	2 × 1,4 ml
PRC	PAXgene RNA Spin Columns (Coluna de rotação PAXgene RNA) (vermelho) <sup>‡</sup>	<b>PAXgene   RNA   COL</b>	5 × 10
PT	Processing Tubes (Tubos de processamento) (2 ml) <sup>§</sup>	<b>PROC   TUBE</b>	6 × 50
Hemogard™	Secondary BD Hemogard Closures (Tampas secundárias BD Hemogard)	<b>SEC   CLOS</b>	50
MCT	Microcentrifuge Tubes (Tubos de microcentrifugação) (1,5 ml) <sup>§</sup>	<b>MIC   TUBE</b>	3 × 50, 1 × 10
RNFD	DNase I, RNase-free (livre de RNase) (liofilizada)	<b>DNA   REM</b>	1500 unidades de Kunitz <sup>¶</sup>
RDD	DNA Digestion Buffer (Tampão de digestão de ADN) (tampa branca)	<b>DNA   DIG   BUF</b>	2 × 2 ml
DRB	DNase Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão de DNase) (tubo, tampa lilás)	<b>DNase   RES   BUF</b>	2 ml
PSC	PAXgene Shredder Spin Columns (lilás) <sup>‡</sup>	<b>PAXgene   SHRED   COL</b>	5 × 10
Manual	Manual do PAXgene Blood RNA Kit (Versão 3)		1

\* Não compatível com reagentes de desinfecção que contenham lixívia. Contém um sal de guanidina. Consulte a página 19 para Informações de segurança.

† O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100% v/v, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

‡ Cada coluna está embalada num blister de utilização única. Consulte as informações de segurança quanto a instruções de eliminação.

§ Os tubos estão disponíveis em embalagens de plástico e cada tubo é de utilização única. Consulte as informações de segurança quanto a instruções de eliminação.

¶ As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente usadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento em  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com o ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* 33, 349 e 363).

## Componentes do kit

Nome do componente	Descrição	Ingrediente ativo	Concentração
BR1	Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)	Nenhum	-
BR2	Binding Buffer (Tampão de ligação)	Tiocianato de guanidina	≥30 para <50% p/p
BR3	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1)	Tiocianato de guanidina Etanol	≥10 para <20% p/p ≥3 para <10% p/p
BR4	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 2) (concentrado)	Nenhum	-
BR5	Elution Buffer (Tampão de eluição)	Nenhum	-
RNFW	RNase-Free Water (Água livre de RNase) (frasco)	Nenhum	-
PK	Proteinase K (tampa verde)	Proteinase K	≥1 para <3% p/p
RNFD	DNase I, RNase-free (livre de RNase) (liofilizada)	DNase	≥90 para ≤100% p/p
RDD	DNA Digestion Buffer (Tampão de digestão de ADN) (tampa branca)	Nenhum	-
DRB	DNase Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão de DNase) (tubo, tampa lilás)	Nenhum	-

## Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

### Para todos os protocolos

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; n.º de cat. 762165)
- Etanol (96-100% v/v, grau de pureza p.a.)
- Pipetas\* (10 µl – 4 ml)
- Ponta de pipeta com proteção contra aerossóis, estéreis e isentas de RNase†
- Proveta graduada‡
- Centrífuga\* capaz de atingir 3000–5000 × g equipada com um rotor de balanço de baldes exterior para segurar os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitador de vórtex\*
- Gelo picado
- Caneta permanente para rotular

\* Assegure-se de que os dispositivos e os instrumentos foram objeto de verificação, manutenção e calibração regulares, de acordo com as recomendações do fabricante.

† Assegure-se de que está familiarizado com as normas sobre a manipulação de ARN (Apêndice A, página 75).

‡ Para a adição de etanol ao concentrado de tampão BR4.



## Para o protocolo manual

- Microcentrífuga de velocidade variável\* capaz de atingir um intervalo de, pelo menos, 1000–8000 × *g*, apesar de forças *g* inferiores e superiores serem aplicáveis (consulte os passos do protocolo para obter detalhes) e equipada com um rotor para MTC de 2 ml
- Incubador-agitador\* capaz de incubar a 55 °C e 65 °C e agitar a ≥400 rpm, não ultrapassando 1400 rpm (por exemplo, Eppendorf® Thermomixer Compact ou equivalente)

## Para o protocolo automatizado

- Tesouras
- QIAcube Connect MDx\* (QIAGEN, n.º de cat. 9003070)

### Consumíveis do QIAcube Connect MDx:

- Filter-Tips, 1000 µl (1024) (QIAGEN, n.º de cat. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, n.º de cat. 990393)†
- Rotor Adapters (10 × 24) (QIAGEN, n.º de cat. 990394)†

### Acessórios do QIAcube Connect MDx:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, n.º de cat. 990392)†

\* Assegure-se de que o dispositivo e o instrumento foram objeto de verificação, manutenção e calibração regulares, de acordo com as recomendações do fabricante.

† Também incluídos no Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, n.º de cat. 990395).

### **Pacotes de serviços QIAcube Connect MDx:**

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, n.º de cat. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, n.º de cat. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, n.º de cat. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, n.º de cat. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, n.º de cat. 9003075)

# Avisos e precauções

Para os clientes na União Europeia, tenha em atenção que poderá ser necessário comunicar qualquer incidente grave, que tenha ocorrido em relação ao dispositivo, ao fabricante e à autoridade reguladora do estado-membro onde o utilizador e/ou o paciente estão estabelecidos.

Para os clientes na União Europeia, tenha em atenção que poderá ser necessário consultar os regulamentos locais para comunicar incidentes graves, que possam ocorrer em relação ao dispositivo, ao fabricante e/ou ao representante autorizado e à autoridade reguladora do local onde o utilizador e/ou doente se encontram.

## Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas e materiais de risco biológico, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) adequadas. Estas estão disponíveis online em formato PDF prático e compacto em [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety), onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a FDS de cada kit QIAGEN e respetivos componentes.

- Todos os produtos químicos e materiais biológicos são potencialmente perigosos. Os espécimes e as amostras de sangue são potencialmente infecciosos e devem ser tratados como materiais de risco biológico.
- Elimine os resíduos biológicos perigosos e os resíduos dos kits de acordo com os procedimentos de segurança locais.

## Informações para casos de emergência

CHEMTREC

Fora dos EUA e do Canadá +1 703-527-3887

## Precauções

Ao trabalhar com sangue, siga as precauções universais, de modo a evitar o risco de potencial exposição a agentes patogénicos transmissíveis pelo sangue (por ex: VIH, hepatite B e outros vírus transmissíveis pelo sangue). Utilize luvas, batas, proteção ocular e outros equipamentos de proteção individual e controlos técnicos para proteção contra a exposição ao sangue. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) adequadas. Estas estão disponíveis online num formato PDF prático e compacto através do site **[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)**, onde pode procurar, visualizar e imprimir as FDS para este kit.

### CUIDADO



NÃO adicione lixívia nem soluções ácidas diretamente aos resíduos provenientes da preparação de amostras.

O tampão de ligação (BR2) e o tampão de lavagem 1 (BR3) contêm tiocianato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando combinado com lixívia. Se o tampão de ligação (BR2) ou o tampão de lavagem 1 (BR3) forem derramados, limpar com detergente laboratorial adequado e água. Se for derramado líquido com agentes potencialmente infecciosos limpe a área afetada primeiro com detergente laboratorial e água e depois com hipoclorito de sódio (lixívia) a 1% (v/v).

A mistura da solução de estabilização de ARN e de sangue do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pode ser desinfetada utilizando 1 volume de solução comercial de lixívia (hipoclorito de sódio a 5%) em 9 volumes da mistura da solução de estabilização de ARN e de sangue.

Os resíduos resultantes da preparação da amostra, tais como sobrenadantes resultantes dos passos de centrifugação no procedimento de isolamento do ARN, devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Utilize contentores para resíduos de risco biológico para eliminar materiais biológicos. A eliminação deve ser realizada de acordo com os regulamentos locais e procedimentos da sua instalação.

Os componentes específicos do PAXgene Blood RNA Kit são de utilização única. Consulte o Conteúdo do kit na página 14 para mais informações sobre componentes individuais.

As frases que se seguem, de perigo e precaução, aplicam-se aos componentes do PAXgene Blood RNA Kit. Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações de segurança sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

#### Buffer BR2



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo por ingestão. Pode ser prejudicial em contacto com a pele e se inalado. Provoca lesões oculares graves. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico. Evitar a libertação para o ambiente. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Eliminar o conteúdo/recipiente num local de eliminação de resíduos aprovado.

### Buffer BR3



Contém: etanol, tiocianato de guanidina. Perigo! Líquido e vapor inflamáveis. Provoca lesões oculares graves. O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico. Manter afastado de calor/faíscas/chamas a descoberto/superfícies quentes. Não fumar. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

### DNase I



Conteúdo: DNase. Perigo! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Evitar inalar poeiras. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Usar proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Retirar o indivíduo para uma zona ao ar livre e mantê-lo confortável para facilitar a respiração. Lavar o vestuário contaminado antes de voltar a usar.

# Armazenamento e manuseamento de reagentes

As colunas de rotação PAXgene RNA (PRC), as colunas de rotação PAXgene Shredder (PSC), a proteinase K (PK) e os tampões (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) devem ser armazenados secos à temperatura indicada no rótulo do kit.

O RNase-Free DNase Set, que contém DNase I (RNFD), tampão de digestão de ADN (RDD) e tampão de ressuspensão de DNase (DRB), é transportado à temperatura ambiente. Armazene todos os componentes do RNase-Free DNase Set imediatamente após a receção, à temperatura indicada no rótulo. Quando armazenado adequadamente, o kit mantém-se estável até ao prazo de validade impresso na caixa do kit.

Devem ser observados os prazos de validade e as condições de armazenamento impressos na caixa e nos rótulos de todos os componentes. Não utilize componentes fora do prazo de validade ou armazenados de forma incorreta.

## Estabilidade na utilização

Após a primeira utilização do kit, os reagentes permanecem estáveis nos frascos originais às temperaturas e até aos prazos de validade indicados no rótulo da caixa do kit .

Os reagentes vertidos para os frascos de reagente do QIAcube Connect MDx permanecem estáveis durante 3 meses após o armazenamento a temperatura ambiente (15 a 25 °C).

A DNase I reconstituída (RNFD) é estável entre 2-8 °C durante 6 semanas no frasco original de vidro (solução-mãe).

As alíquotas de utilização única da solução-mãe em MCT de 1,5 ml (fornecidos com o kit) permanecem estáveis durante 9 meses em armazenamento a -20 °C. Após o descongelamento, as alíquotas de utilização única permanecem estáveis durante 6 semanas em armazenamento entre 2-8 °C.

## Colheita, armazenamento e manuseamento de espécimes

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à utilização com sangue colhido nos PAXgene Blood RNA Tubes. O sangue deve ser colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do Manual do PAXgene Blood RNA Tube. Se necessário, consulte o Apêndice C (página 82) para obter recomendações sobre a manipulação de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Todas as amostras devem ser tratadas como material potencialmente perigoso. As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System apenas foram estabelecidas com as transcrições dos genes FOS e IL1B, que podem ser visualizadas nas páginas 43-46.



# Protocolo: Isolamento manual do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes

## Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que a caixa do kit está intacta e não se apresenta danificada e que os tampões não apresentam fugas. Não utilize um kit que esteja danificado.
- Durante a utilização de uma pipeta, certifique-se de que está definida para o volume correto e que o líquido é cuidadosa e totalmente aspirado e dispensado.
- Para evitar transferir amostras para o tubo ou coluna de rotação errados, assegure-se de que todos os tubos e colunas de rotação são corretamente rotulados com uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de cada tubo (PT, MCT). Para as colunas de rotação, rotule o corpo do respetivo PT. Feche todos os tubos ou colunas de rotação depois de ter sido transferido líquido.
- Derrames acidentais de amostras e tampões durante o procedimento podem reduzir o rendimento e a pureza do ARN.
- Salvo indicação em contrário, todos os passos deste protocolo, incluindo os passos de centrifugação, devem ser efetuados à temperatura ambiente (15-25 °C).

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as seguintes precauções indicadas são necessárias quando se manipulam amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra para a coluna de rotação (PSC, PRC) sem humedecer a borda da coluna.
- Trocar sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Use pontas de pipeta com proteção contra aerossóis.
- Evite tocar na membrana da coluna de rotação (PSC, PRC) com a ponta da pipeta.

- Depois de agitar um MCT no vórtex ou depois de o aquecer, centrifugue-o durante breves instantes para eliminar gotas do interior da tampa.
- Utilizar luvas durante todo o procedimento. Em caso de contacto entre as luvas e a amostra, troque imediatamente de luvas.
- Feche a coluna de rotação (PSC, PRC) antes de a colocar na microcentrifuga. Centrifugue conforme descrito no procedimento.
- Abra apenas uma coluna de rotação (PSC, PRC) de cada vez e tenha cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Para um processamento eficiente de amostras múltiplas em paralelo, encha um suporte com PT para os quais as colunas de rotação (PSC, PRC) possam ser transferidas depois da centrifugação. Elimine os PT utilizados, que contenham produto residual, e coloque as colunas de rotação (PSC e PRC) em novos PT antes de transferir de volta para a microcentrifuga.

### **Passos a seguir antes de iniciar o procedimento**

- O sangue deve ser colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*. Se necessário, consulte o Apêndice C (página 82) para obter recomendações sobre a manipulação de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) são incubados durante, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente depois da colheita de sangue, para garantir a lise completa das células sanguíneas e precipitação de ARN. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) de um dia para o outro pode aumentar os rendimentos. Se a incubação do sangue à temperatura ambiente durante 2 h não tiver sido realizada antes do armazenamento a 2–8 °C, -20 °C ou -70 °C, deve primeiro equilibrar o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para temperatura ambiente e, em seguida, incubá-lo a esta temperatura durante 2 h antes de iniciar o procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 19.

- Leia também as normas sobre manipulação de ARN (Apêndice A, página 79).
- Assegure-se de que os instrumentos, como pipetas e incubador-agitador, foram verificados e calibrados regularmente, de acordo com as recomendações do fabricante.
- Para os passos 5 e 20, é necessário um incubador-agitador. Ajuste a temperatura do incubador-agitador para 55 °C.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se for necessário, aqueça a 37 °C para dissolvê-lo.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100% v/v, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver a utilizar o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare uma solução-mãe de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades de Kunitz)\* em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tenha cuidado para não perder DNase I (RNFD) ao abrir o frasco. Não agite a DNase I reconstituída (RNFD) no vórtex. A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser efetuada apenas invertendo suavemente o frasco.
- A DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada entre 2–8 °C no frasco de vidro original (solução-mãe) ou a –20 °C após remoção da solução-mãe do frasco de vidro e divisão em alíquotas de utilização única (utilize o MCT de 1,5 ml, fornecido com o kit. Existem MCT suficientes para cinco alíquotas). As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2–8 °C. Não volte a congelar as alíquotas após o descongelamento.
- Durante a reconstituição e criação de alíquotas de DNase I (RNFD), certifique-se de que as normas sobre a manipulação de ARN são cumpridas (Apêndice A, página 79).

\* As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente utilizadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento em  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

## Procedimento

1. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 min a 3000–5000 × g utilizando um rotor de balanço de baldes.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas e precipitação a de ARN.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos com base redonda. Se forem usados outros tipos de adaptadores de tubo, os tubos podem partir-se durante a centrifugação.

2. Retire o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 ml de RNase-Free Water (RNFW) ao pellet e feche o tubo utilizando uma nova tampa secundária BD Hemogard (fornecida com o kit).

Se o sobrenadante for decantado, tenha cuidado para não interferir com o pellet e seque a borda do tubo com um toalhete de papel limpo.

3. Misturar no vórtex até à dissolução visível do pellet e centrifugar durante 10 min a 3000–5000 × g utilizando um rotor de balanço de baldes. Retire e elimine todo o sobrenadante.

Pequenos detritos que permaneçam no sobrenadante após a agitação no vórtex, mas antes da centrifugação não irão afetar o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante irá inibir a lise e diluir o lisado e, conseqüentemente, afetar as condições para ligação do ARN à membrana do PAXgene.

4. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite no vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
5. Pipete a amostra para um MCT de 1,5 ml. Adicione 300 µl de tampão de ligação (BR2) e 40 µl de proteinase K (PK). Misture, agitando no vórtex durante 5 s e incube durante 10 min a 55 °C utilizando um incubador-agitador a 400–1400 rpm.

Depois da incubação, ajuste a temperatura do incubador-agitador para 65 °C (para o passo 20).



Não misture o tampão de ligação (BR2) e a proteinase K (PK) antes de os adicionar à amostra.

6. Pipete o lisado diretamente para uma PSC (lilás) colocada num PT de 2 ml e centrifugue durante 3 min à velocidade máxima (mas não exceder 20 000 × g).



Pipete cuidadosamente o lisado para a coluna de rotação (PSC) e verifique visualmente se foi totalmente transferido para a coluna de rotação (PSC).

Para evitar danos nas colunas (PSC) e nos tubos (PT), não exceda 20 000 × g.



Algumas amostras podem fluir pela coluna de rotação PSC sem centrifugação. Tal deve-se à baixa viscosidade de algumas amostras e não deve ser considerado como indicação de falha do produto.

7. Transfira cuidadosamente a totalidade do sobrenadante do produto residual para um MCT de 1,5 ml novo, sem interferir com o pellet no PT.
8. Adicione 350 µl de etanol (96–100% v/v, grau de pureza p.a.). Misture, agitando no vórtex e centrifugue durante breves instantes (1–2 s a 500–1000 × g) para eliminar gotas do interior da tampa do tubo.



A duração da centrifugação não deve exceder 1–2 s, dado que tal pode resultar na formação de pellets de ácidos nucleicos e na redução do rendimento do ARN total.

9. Pipete 700 µl de amostra para a PRC (vermelha) colocada num PT de 2 ml e centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num PT de 2 ml novo e elimine o PT antigo que contém o produto residual.
10. Pipete a amostra restante para a PRC e centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num PT de 2 ml novo e elimine o PT que contém o produto residual.



Pipete cuidadosamente a amostra para a coluna de rotação (PRC) e verifique visualmente se a amostra foi totalmente transferida para a coluna de rotação (PRC).

11. Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) para a PRC. Centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num PT de 2 ml novo e elimine o PT que contém o produto residual.
12. Adicione 10 µl de solução-mãe de DNase I (RNFD) a 70 µl de tampão de digestão de ADN (RDD) num MCT de 1,5 ml. Misture, agitando suavemente o tubo e centrifugue durante breves instantes para recolher líquido residual dos lados do tubo.

Se estiverem a ser processadas, por exemplo, 10 amostras, adicione 100 µl de solução-mãe de DNase I (RNFD) a 700 µl de tampão de digestão de ADN (RDD). Utilize os MCT de 1,5 ml fornecidos com o kit.



A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura apenas deve ser efetuada agitando suavemente o tubo. Não agite no vórtex.

13. Pipete a mistura de incubação de DNase I (RNFD) (80 µl) diretamente para a membrana da PRC e coloque na bancada (20–30 °C) durante 15 min.



Certifique-se de que a mistura de incubação de DNase I (RNFD) é colocada diretamente na membrana. A digestão da DNase poderá ser incompleta se parte da mistura for aplicada e permanecer nas paredes ou na anilha da coluna de rotação (PRC).

14. Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) para a PRC e centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num PT de 2 ml novo e elimine o PT antigo que contém o produto residual.
15. Pipete 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) para a PRC e centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num PT de 2 ml novo e elimine o PT antigo que contém o produto residual.



O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Certifique-se que adiciona etanol ao tampão de lavagem 2 (BR4) antes da utilização (consulte "Passos a seguir antes de iniciar o procedimento", página 26).

16. Adicione mais 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) à PRC. Centrifugue durante 3 min a 8000–20 000 × g.
17. Elimine o PT que contém o produto residual e coloque a PRC num PT de 2 ml. Centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × g.
18. Elimine o PT que contém o produto residual. Coloque a PRC num MCT de 1,5 ml e pipete 40 µl de tampão de eluição (BR5) diretamente para a membrana da PRC. Centrifugue durante 1 min a 8000–20 000 × g para eluir o ARN.  
É importante molhar a totalidade da membrana com tampão de eluição (BR5) para obter a máxima eficiência de eluição.
19. Repita o passo de eluição (passo 18) conforme descrito, utilizando 40 µl de tampão de eluição (BR5) e o mesmo MCT.
20. Incube o eluato durante 5 min a 65 °C no incubador-agitador (do passo 5) sem agitar. Depois da incubação, arrefeça imediatamente em gelo.



Esta incubação de amostras a 65 °C desnatura o ARN para aplicações a jusante. Mesmo que a aplicação a jusante inclua um passo de desnaturação por calor, não omita este passo. A desnaturação de ARN suficiente é essencial a este ponto para a máxima eficiência em aplicações a jusante.

Não exceder o tempo nem a temperatura de incubação.

21. Caso não utilize as amostras de ARN de imediato, armazene-as a -20 °C ou -70 °C.

Dado que o ARN se mantém desnaturado após ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, não é necessário repetir a incubação a 65 °C. Se as amostras de ARN forem utilizadas num ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para quantificação exata do ARN por medição da absorvância a 260 nm, é recomendável diluir as amostras com 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5.\* A diluição da amostra com RNase-Free Water poderá resultar em valores muito baixos pouco fiáveis.

Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.



Para quantificação em tampão Tris HCl, utilize a relação  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Consulte o Apêndice B, página 80.

22. Volte a fechar os frascos que contêm tampões e água isenta de RNase, frascos e tubos que contêm enzimas e tampões de enzimas e embalagens com materiais de plástico do kit utilizado para o protocolo. Armazene os restantes conteúdos do kit como descrito na secção "Armazenamento e manuseamento de reagentes" (página 23) e "Estabilidade na utilização" (página 23) até à próxima utilização.

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.



# Protocolo: Isolamento automatizado do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que a caixa do kit está intacta e não se apresenta danificada e que os tampões não apresentam fugas. Não utilize um kit que esteja danificado.
- Durante a utilização de uma pipeta, certifique-se de que está definida para o volume correto e que o líquido é cuidadosa e totalmente aspirado e dispensado.
- Para evitar transferir amostras para os tubos e consumíveis plásticos errados, assegure-se de que todos os PT, MCT e adaptadores do rotor são corretamente rotulados com uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de todos os MCT, o corpo de todos os PT e a parede exterior de todos os adaptadores do rotor.
- Derrames acidentais de amostras e tampões durante o procedimento podem reduzir o rendimento e a pureza do ARN.
- Salvo indicação em contrário, todos os passos deste protocolo, incluindo os passos de centrifugação, devem ser efetuados à temperatura ambiente (15-25 °C).

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as seguintes precauções indicadas são necessárias quando se manipulam amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra na base do PT sem humedecer a borda do tubo.
- Trocar sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Use pontas de pipeta com proteção contra aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de rotação (PSC, PRC) com a ponta da pipeta.
- Depois de agitar um MCT no vórtex ou depois de o aquecer, centrifugue-o durante breves instantes para eliminar gotas do interior da tampa.
- Utilizar luvas durante todo o procedimento. Em caso de contacto entre as luvas e a amostra, troque imediatamente de luvas.

### Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- O sangue deve ser colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*. Se necessário, consulte o Apêndice C (página 82) para obter recomendações sobre a manipulação de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) são incubados durante, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente depois da colheita de sangue, para garantir a lise completa das células sanguíneas e precipitação de ARN. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) de um dia para o outro pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, -20 °C ou -70 °C depois da colheita de sangue, equilibre-o primeiro até à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente durante 2 horas antes de iniciar o procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 19.
- Leia "Notas importantes", página 60.
- Leia também as normas sobre manipulação de ARN (Apêndice A, página 79).
- Leia o Manual do utilizador do QIAcube Connect MDx apropriado e todas as informações adicionais fornecidas com o instrumento, prestando especial atenção às informações de segurança.
- Assegure-se de que os dispositivos e instrumentos, como pipetas e o QIAcube Connect MDx, foram verificados e calibrados regularmente, de acordo com as recomendações do fabricante.

- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se for necessário, aqueça a 37 °C para dissolvê-lo.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione o volume apropriado de etanol (96 a 100% v/v, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver a utilizar o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare uma solução-mãe de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades de Kunitz)\* em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tenha cuidado para não perder DNase I (RNFD) ao abrir o frasco. Não agite a DNase I reconstituída (RNFD) no vórtex. A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser efetuada apenas invertendo suavemente o frasco.
- A DNase I reconstruída (RNFD) pode ser armazenada entre 2–8 °C no frasco de vidro original (solução-mãe) ou a –20 °C após remoção da solução-mãe do frasco de vidro e divisão em alíquotas de utilização única (utilize o MCT de 1,5 ml, fornecido com o kit. Existem MCT suficientes para cinco alíquotas). As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas entre 2–8 °C. Não volte a congelar as alíquotas após o descongelamento.
- Durante a reconstituição e criação de alíquotas de DNase I (RNFD), certifique-se de que as normas sobre a manipulação de ARN são cumpridas (Apêndice A, página 79).
- Instale o adaptador do agitador correto (incluído com o QIAcube Connect MDx; use o adaptador para tubos com fecho de segurança de 2 ml, marcado com "2") e coloque o suporte do agitador em cima do adaptador.
- Inspeccione a gaveta de resíduos e esvazie-a, se necessário.

\* As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente utilizadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento em  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

- Instale quaisquer protocolos relacionados, se isso ainda não tiver sido feito para os ensaios anteriores. O QIAcube Connect MDx requer que todos os protocolos encontrados no ficheiro zip relacionado sejam descarregados. Consulte "Instalar protocolos no QIAcube Connect MDx", na página 62.

## Procedimento

1. Feche a cobertura do QIAcube Connect MDx e ligue o instrumento através do interruptor de alimentação (consulte a Figura 15, página 61).

É emitido um sinal sonoro e apresentado o ecrã de arranque. O instrumento efetua automaticamente testes de inicialização.

2. Abra a cobertura do QIAcube Connect MDx e carregue os reagentes e materiais de plástico necessários no instrumento. Consulte "Carregar o QIAcube Connect MDx", na página 63.

Para poupar tempo, o carregamento pode ser efetuado durante um ou ambos os passos de centrifugação de 10 min subsequentes (passos 3 e 5).

3. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 min a 3000–5000 x g utilizando um rotor de balanço de baldes.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 h à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas e a precipitação de ARN.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos com base redonda. Se forem usados outros tipos de adaptadores de tubo, os tubos podem partir-se durante a centrifugação.

4. Retire o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Se o sobrenadante for decantado, tenha cuidado para não interferir com o pellet e seque a borda do tubo com um toallete de papel limpo. Adicione 4 ml de RNase-Free Water (RNFw) ao pellet e feche o tubo utilizando uma nova tampa secundária BD Hemogard (fornecida com o kit).

5. Misturar no vórtex até à dissolução visível do pellet e centrifugar durante 10 min a 3000–5000 × g utilizando um rotor de balanço de baldes. Retire e elimine todo o sobrenadante.

Pequenos detritos que permaneçam no sobrenadante após a agitação no vórtex, mas antes da centrifugação não irão afetar o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante irá inibir a lise e diluir o lisado e, conseqüentemente, afetar as condições para ligação do ARN à membrana do PAXgene.

6. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite no vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
7. Pipete a amostra para um PT de 2 ml.



Utilize os PT de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

8. Carregue os PT abertos que contêm amostras no agitador QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 65). As posições da amostra estão numeradas para facilitar o carregamento. Introduza rolhas de suporte do agitador (incluídas com o QIAcube Connect MDx) nas ranhuras existentes na extremidade do suporte do agitador junto a cada PT. Tal permite a detecção de amostras durante a verificação do carregamento.



Certifique-se de que está instalado o adaptador do agitador correto (adaptador do agitador, 2 ml, tubos com fecho de segurança, marcados com "2", incluídos com o QIAcube Connect MDx).



Se forem processadas menos de 12 amostras, certifique-se de que carrega o suporte do agitador conforme demonstrado na Figura 22, página 69. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Os números de posição no suporte do agitador correspondem aos números de posição na centrífuga.

9. Feche a cobertura do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 61).
10. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" e inicie o protocolo.

Siga as instruções que surgem no ecrã tátil do QIAcube Connect MDx.



Certifique-se de que estão instaladas as duas partes do programa (parte A e parte B) no QIAcube Connect MDx (consulte "Instalar protocolos no QIAcube Connect MDx", página 62).



O equipamento irá efetuar verificações de carregamento das amostras, pontas, adaptadores do rotor e frascos de reagente.

11. Depois do protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" terminar, abra a cobertura do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 61). Retire e elimine as PRC dos adaptadores do rotor e os PT vazios do agitador.



Durante o ensaio, as colunas de rotação são transferidas da posição 1 do adaptador do rotor (posição da tampa L1) para a posição 3 do adaptador do rotor (posição da tampa L2) pelo instrumento (consulte a Figura 20, página 67).

12. Feche as tampas de todos os MCT de 1,5 ml que contêm o ARN purificado nos adaptadores do rotor (posição 3, posição da tampa L3, consulte a Figura 20, página 67). Transfira os MCT de 1,5 ml para o adaptador do agitador QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 65).

13. Feche a cobertura do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 61).

14. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA Part B" e inicie o protocolo.

Siga as instruções que surgem no ecrã tátil do QIAcube Connect MDx.



Este programa incuba as amostras a 65 °C e desnatura o ARN para aplicações a jusante. Mesmo que a aplicação a jusante inclua um passo de desnaturação por calor, não omita este passo. A desnaturação de ARN suficiente é essencial a este ponto para a máxima eficiência em aplicações a jusante.

15. Depois do programa "PAXgene Blood RNA Part B" terminar, abra a cobertura do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 61). Coloque imediatamente os MCT que contêm o ARN purificado em gelo.



AVISO: Superfície quente. O agitador pode atingir temperaturas até 70 °C. Evite tocar no mesmo quando estiver quente.



Não deixe o ARN purificado permanecer no QIACube Connect MDx. Dado que as amostras não são arrefecidas, o ARN purificado pode degradar-se. Por conseguinte, não são recomendados ensaios de preparação de amostras sem vigilância durante a noite.

16. Caso não utilize as amostras de ARN de imediato, armazene-as a -20 °C ou -70 °C.

Dado que o ARN permanece desnaturado após ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, não é necessário repetir o protocolo de incubação por calor ("PAXgene Blood RNA Part B"). Se as amostras de ARN forem utilizadas num ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para quantificação exata do ARN por medição da absorvância a 260 nm, é recomendável diluir as amostras em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5.\* A diluição da amostra com RNase-Free Water poderá resultar em valores muito baixos pouco fiáveis.

Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.



Para quantificação em tampão Tris-HCl, utilize a relação  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Consulte o Apêndice B, página 80.

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

17. Retire o suporte de frascos de reagente da mesa de trabalho do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 65) e feche todos os frascos de reagentes com tampas adequadamente rotuladas. Volte a fechar os frascos que contêm tampões e água isenta de RNase, frascos e tubos que contêm enzimas e tampões de enzimas e embalagens com materiais de plástico do kit utilizado para o protocolo. Armazene os restantes conteúdos do kit e os frascos de reagente como descrito na secção "Armazenamento e manuseamento de reagentes" (página 23) e "Estabilidade na utilização" (página 23) até à próxima utilização.

Retire e elimine os reagentes restantes nos PT nas ranhuras dos MCT do QIAcube Connect MDx. Retire e elimine os adaptadores do rotor da centrífuga. Esvazie a gaveta de resíduos do QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 15, página 61). Feche a cobertura do instrumento desligue o instrumento no interruptor de alimentação.



## Limitações de utilização do produto

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se ao isolamento de ARN intracelular do sangue total humano ( $4,8 \times 10^6$ –  $1,1 \times 10^7$  leucócitos/ml) para aplicações de diagnóstico in vitro. Não se destina ao isolamento de ADN genómico, nem de ácidos nucleicos virais a partir de sangue total humano. Dado o número limitado de transcrições validadas para as especificações de estabilização (transcrições dos genes FOS e IL1B), não é possível estabelecer características de desempenho para todas as transcrições. Os utilizadores devem proceder à revisão dos dados do fabricante e dos seus próprios dados para determinar se é necessária validação para outras transcrições. Os componentes do kit destinam-se apenas a utilização nos protocolos manuais e automatizados descritos nas instruções de utilização.

Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações sobre a utilização dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do PAXgene Blood RNA Kit são testados face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

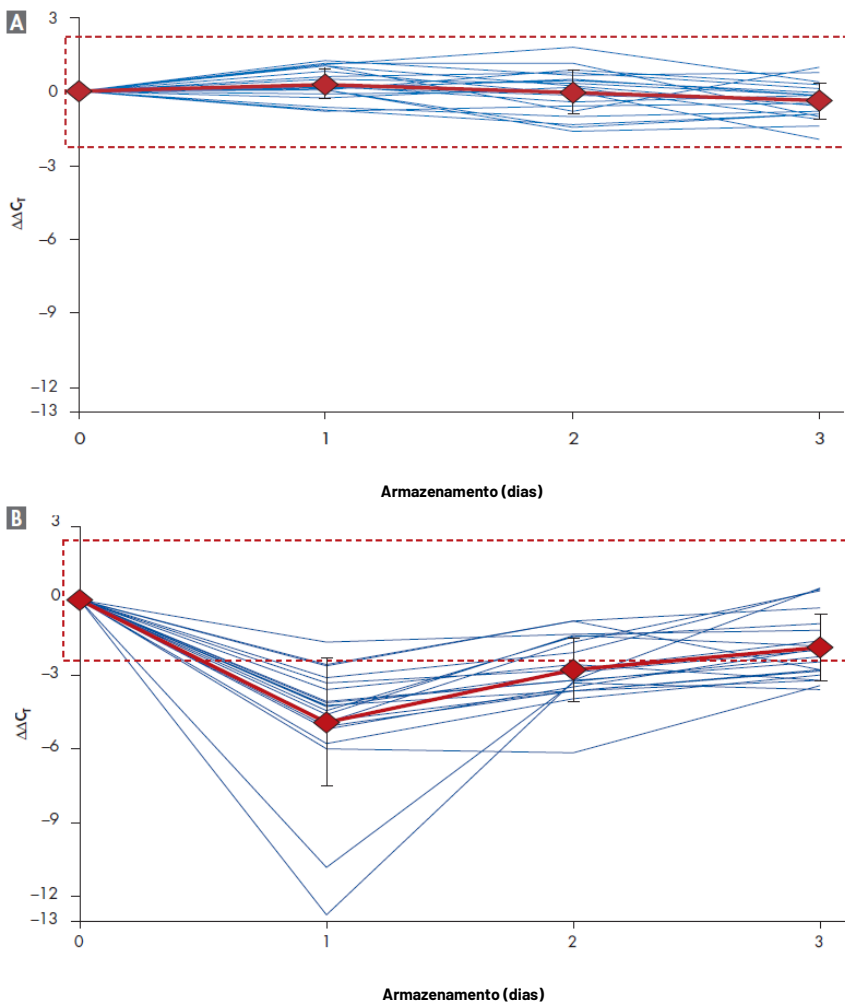
# Características de desempenho

## Colheita e estabilização da amostra

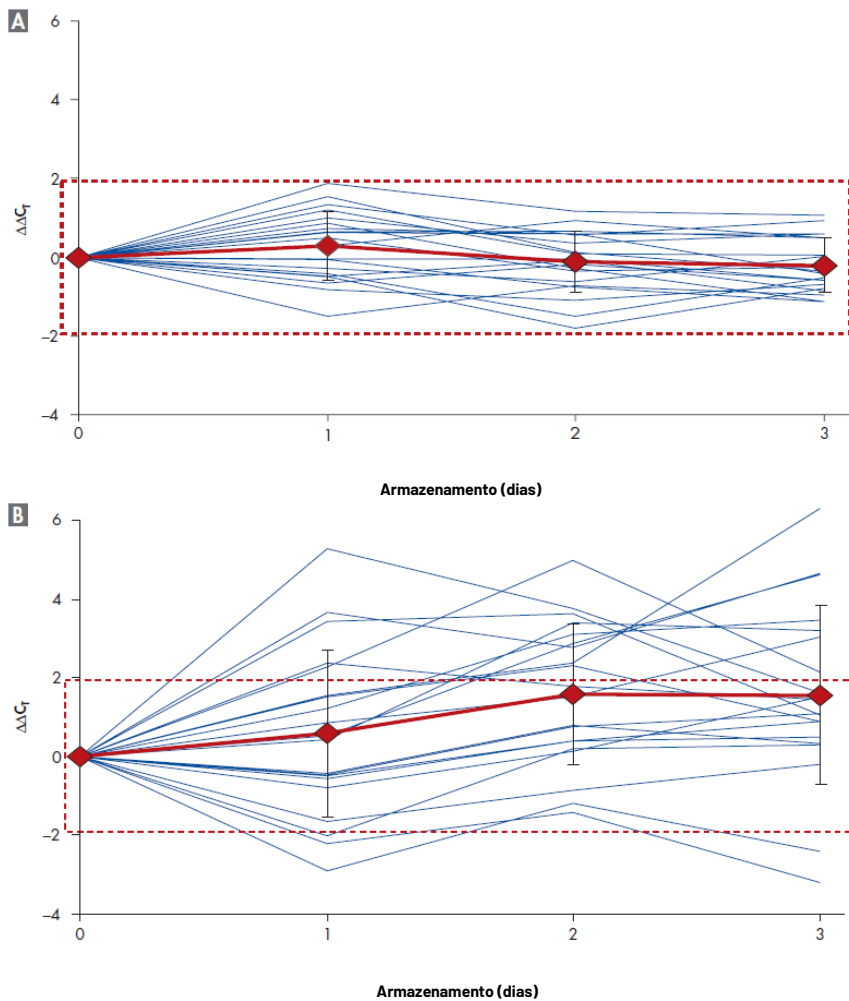
Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contêm um reagente de estabilização de ARN patenteado. Este aditivo protege as moléculas de ARN da degradação por RNases e reduz as modificações ex-vivo da expressão gênica ao mínimo. Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) destinam-se à colheita de sangue total humano e estabilização de ARN celular durante até 3 dias a 18–25 °C (Figura 4 e Figura 5, páginas 43 e 44, respetivamente) ou até 5 dias a 2–8 °C (Figura 6 e Figura 7, páginas 45 e 46). Além disso, o sangue estabilizado pode ser armazenado no congelador. Os dados atualmente disponíveis mostram estabilização do ARN celular durante um período mínimo de 11 anos a -20 °C ou -70 °C\*. Para obter mais informações provenientes de estudos em curso que avaliam a estabilidade durante períodos de tempo mais longos, visite [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) ou contacte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

A duração real da estabilização do ARN pode variar, dependendo da espécie de ARN celular e da aplicação a jusante utilizada. Dado o número limitado de transcrições validadas para as especificações de estabilização (transcrições dos genes FOS e IL1B), não é possível estabelecer características de desempenho para todas as transcrições. Os utilizadores devem proceder à revisão dos dados do fabricante e dos seus próprios dados para determinar se é necessária validação para outras transcrições.

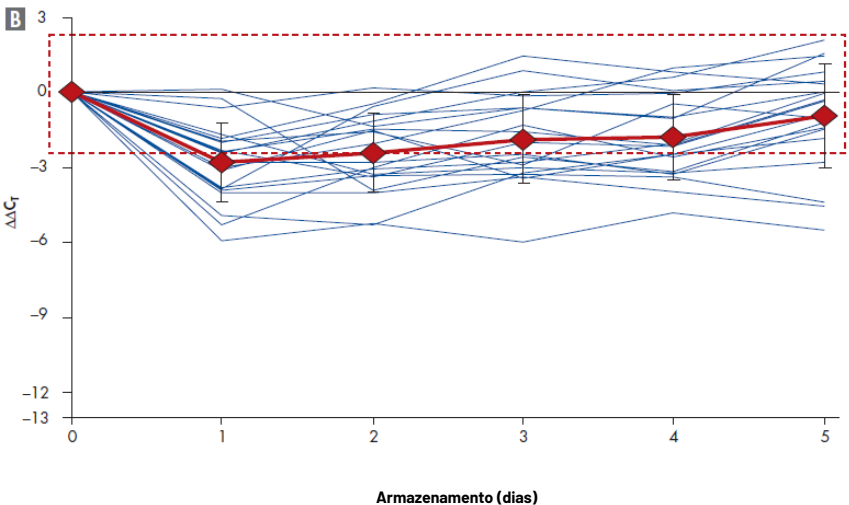
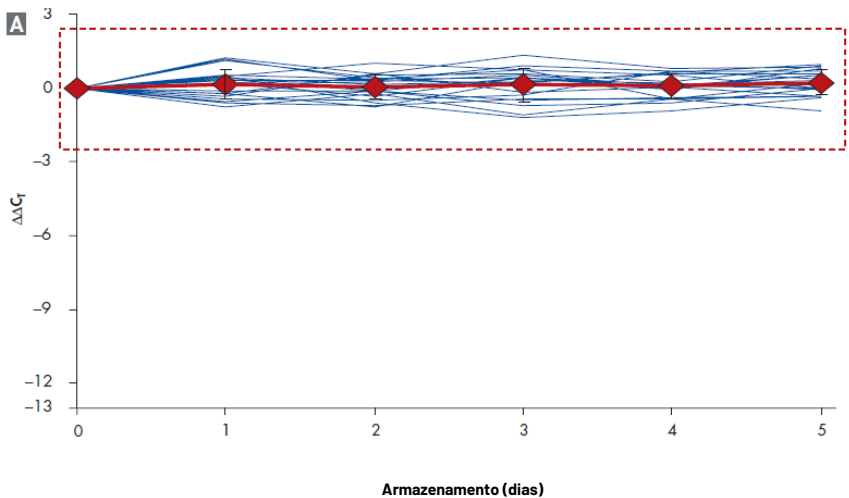
\* Está em curso um estudo de longa duração sobre a conservação de sangue em PAXgene Blood RNA Tubes.



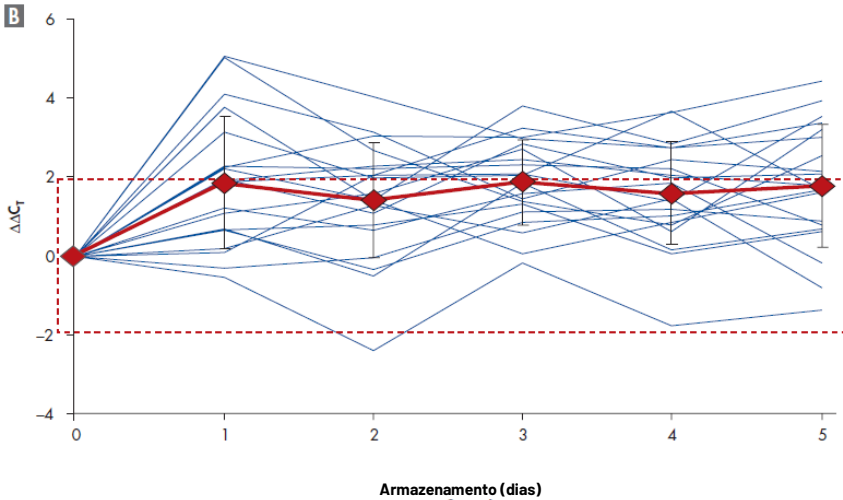
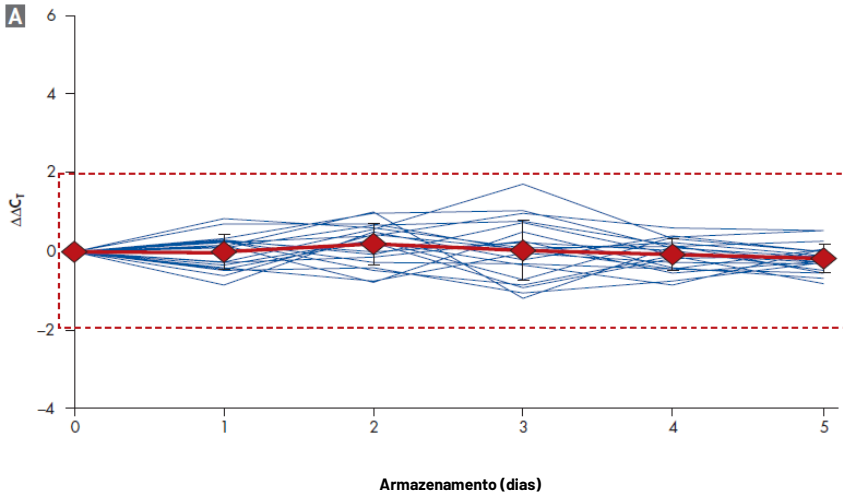
**Figura 4: Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 18–25 °C: FOS.** Foi colhido sangue de 10 doadores aparentemente saudáveis, com amostras duplicadas e armazenadas a 18–25 °C durante o número de dias indicado, seguido por isolamento do ARN total. **[A]** Procedeu-se à colheita de sangue, que foi armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), e o ARN total foi purificado utilizando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi colhido e armazenado em tubos para colheita de sangue padrão com EDTA como anticoagulante e o ARN total foi purificado com um método de isolamento padrão com solvente orgânico e purificação do ARN baseada em membrana de silício. Os níveis de transcrição relativos ao FOS foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3 \times$  do ensaio ( $2,34 C_T$ ).



**Figura 5: Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 18–25 °C: IL1B.** Procedeu-se à colheita de sangue e à purificação do ARN total, após armazenamento a 18–25 °C, conforme descrito na Figura 4. Os níveis de transcrição relativos ao IL1B foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3 \times$  do ensaio ( $1,93 C_T$ ).



**Figura 6: Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 2–8 °C: FOS.** Foi colhido sangue a 10 doadores, com amostras duplicadas e armazenadas a 2–8 °C durante o número de dias indicado, seguido por isolamento do ARN total. **[A]** Procedeu-se à colheita de sangue, que foi armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), e o ARN total foi purificado utilizando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi colhido e armazenado em tubos para colheita de sangue padrão com EDTA como anticoagulante e o ARN total foi purificado com um método de isolamento padrão com solvente orgânico e purificação do ARN baseada em membrana de sílicio. Os níveis de transcrição relativos ao FOS foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3 \times$  do ensaio ( $2,34 C_t$ ).



**Figura 7: Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 2-8 °C: IL1B.** Procedeu-se à colheita de sangue e à purificação do ARN total, após armazenamento a 2-8 °C, conforme descrito na Figura 6. Os níveis de transcrição relativos ao IL1B foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3 \times$  do ensaio ( $1,93 C_{T1}$ ).

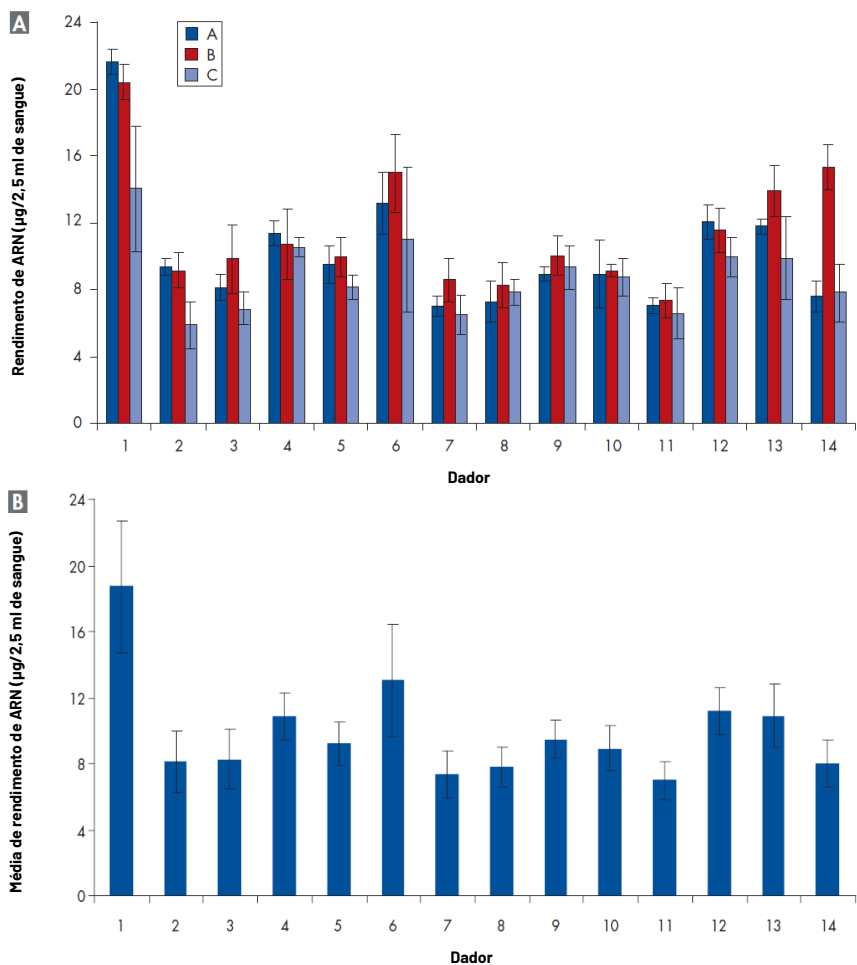
## Isolamento manual de ARN

O ARN total isolado com o PAXgene Blood RNA System é puro. Utilizando o protocolo manual, os valores de  $A_{260}/A_{280}$  estão entre 1,8 e 2,2 e está presente uma quantidade  $\leq 1\%$  (p/p) de ADN genómico numa quantidade  $\geq 95\%$  de todas as amostras, conforme determinado por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene da beta-actina. Pelo menos 95% das amostras não apresentam qualquer inibição em RT-PCR quando o eluato representa 30% do volume de reação de RT-PCR.

Usando o protocolo manual, o tempo médio de preparação da amostra (com base em dados de 12 ensaios de preparação de amostras) é de, aproximadamente 90 min\*, com apenas 40 min de tempo de manipulação. Os rendimentos de ARN de 2,5 ml de sangue total humano saudável são  $\geq 3 \mu\text{g}$  para  $\geq 95\%$  das amostras processadas. Dado que os rendimentos são altamente dependentes do dador, os rendimentos individuais podem variar. Para dadores individuais, o PAXgene Blood RNA System oferece rendimentos altamente reprodutíveis e repetíveis (Figura 8 e Figura 9, páginas 48 e 49, respetivamente), assim como resultados da RT-PCR também reprodutíveis e repetíveis (Figura 10 e Figura 11, páginas 54 e 55, respetivamente), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

A Figura 8 (página 48) indica a reprodutibilidade e a repetibilidade do PAXgene Blood RNA System. Foram realizados estudos adicionais para mostrar a influência de diferentes lotes de PAXgene Blood RNA Kit e de diferentes técnicos na reprodutibilidade do rendimento do ARN e no desempenho da RT-PCR em tempo real. Dado que para estes estudos foram utilizadas amostras de sangue em pools em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais, os resultados não refletem a repetibilidade do sistema, incluindo a flutuação entre as colheitas de sangue individuais, mas apenas a repetibilidade da preparação das amostras (consulte a Figura 9, página 49).

\* Tempo de teste do protocolo total, incluindo manipulação adiantada dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem do pellet e ressuspensão do pellet).



**Figura 8: Isolamento de ARN reprodutível e repetível.** Amostras de sangue quadruplicadas de 14 dadores foram manualmente processadas por 3 técnicos de laboratórios diferentes (A, B, C). Utilizaram-se três conjuntos de equipamento e todas as amostras preparadas por um único técnico foram processadas usando o mesmo equipamento. [A] Mostram-se os desvios médios e padrão do rendimento de ARN por amostras replicadas dos mesmos dadores e de técnicos diferentes. [B] Doze amostras de sangue replicadas de cada um dos 14 dadores foram processadas pelos 3 técnicos diferentes. São apresentados os desvios médios e padrão do rendimento de ARN por amostras dos mesmos dadores e de todos os técnicos. Para todas as amostras de ARN, as relações de  $A_{280}/A_{280}$  variaram entre 1,8 e 2,2.



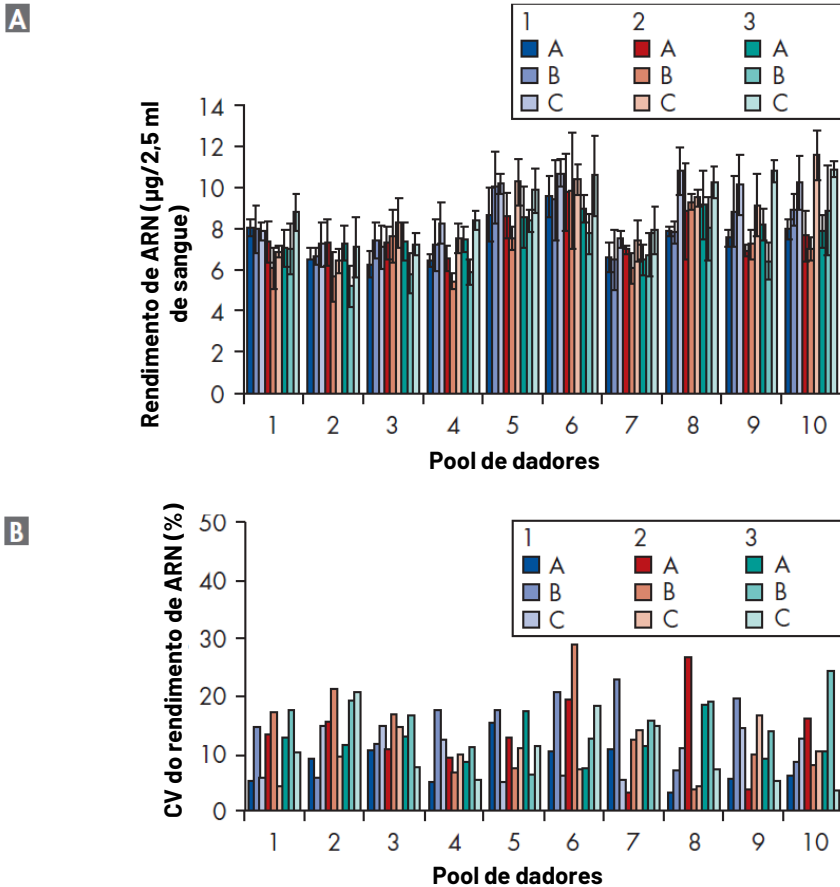


Figura 9: Repetibilidade e reprodutibilidade do rendimento de ARN por técnicos diferentes e diferentes lotes do PAXgene Blood RNA Kit utilizando amostras de sangue de pools. Foram colhidas amostras de sangue de 30 doadores diferentes em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 tubos por doador, 360 tubos no total). O conteúdo dos tubos de 3 doadores foi agrupado em pool e, subsequentemente, novamente dividido em 36 aliquotas de amostras. Estas 36 amostras por pool de 3 doadores foram processadas manualmente por 3 técnicos diferentes. Cada técnico utilizou 3 lotes diferentes do PAXgene Blood RNA Kit para o isolamento de ARN e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 10 pools de doadores. [A] Rendimento de ARN e desvio-padrão para combinação técnico/ lote. As amostras de sangue quadruplicadas de 10 pools de doadores foram processadas por 3 técnicos diferentes (A, B, C) com cada um dos 3 lotes do kit (1, 2, 3). São apresentados os rendimentos médios (colunas) e desvios-padrão (barras de erro) por amostra quadruplicada do mesmo pool de doadores pelos diferentes técnicos e lotes de kit. [B] Coeficiente de variação (CV) do rendimento do ARN por pool de doadores para todas as combinações técnico/ lote (A, B, C; 1, 2, 3) conforme calculado a partir do rendimento médio e desvio padrão do rendimento mostrados na Figura 9A.

**Tabela 1A: Reprodutibilidade em cada lote e utilizador para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Pool de dadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, utilizador A	8,03	0,42	5	9,55	0,99	10
Lote 1, utilizador B	7,98	1,17	15	9,38	1,94	21
Lote 1, utilizador C	7,87	0,45	6	10,71	0,65	6
Lote 2, utilizador A	7,32	0,98	13	9,78	1,89	19
Lote 2, utilizador B	6,09	1,04	17	9,82	2,83	29
Lote 2, utilizador C	6,87	0,31	4	10,37	0,74	7
Lote 3, utilizador A	7,04	0,90	13	8,96	0,68	8
Lote 3, utilizador B	6,98	1,22	17	7,73	0,97	13
Lote 3, utilizador C	8,78	0,89	10	10,59	1,94	18
Combinação de dados	Pool de dadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, utilizador A	7,52	0,41	6	7,96	0,49	6
Lote 1, utilizador B	8,82	1,72	19	8,90	0,76	9
Lote 1, utilizador C	10,14	1,46	14	10,22	1,29	13
Lote 2, utilizador A	6,92	0,27	4	7,63	1,23	16
Lote 2, utilizador B	7,20	0,71	10	7,00	0,56	8
Lote 2, utilizador C	9,14	1,52	17	11,56	1,21	10
Lote 3, utilizador A	8,18	0,76	9	7,85	0,82	10
Lote 3, utilizador B	6,41	0,88	14	8,88	2,17	24
Lote 3, utilizador C	10,78	0,56	5	10,88	0,37	3

**Tabela 1B: Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes para os pools de dadores selecionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Pool de dadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Utilizador A, todos os lotes	7,46	0,85	11	9,43	1,22	13
Utilizador B, todos os lotes	7,02	1,31	19	8,98	2,09	23
Utilizador C, todos os lotes	7,84	0,98	13	10,56	1,15	11
	Pool de dadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Utilizador A, todos os lotes	7,54	0,72	10	7,81	0,82	11
Utilizador B, todos os lotes	7,48	1,50	20	8,26	1,54	19
Utilizador C, todos os lotes	10,02	1,34	13	10,89	1,10	10

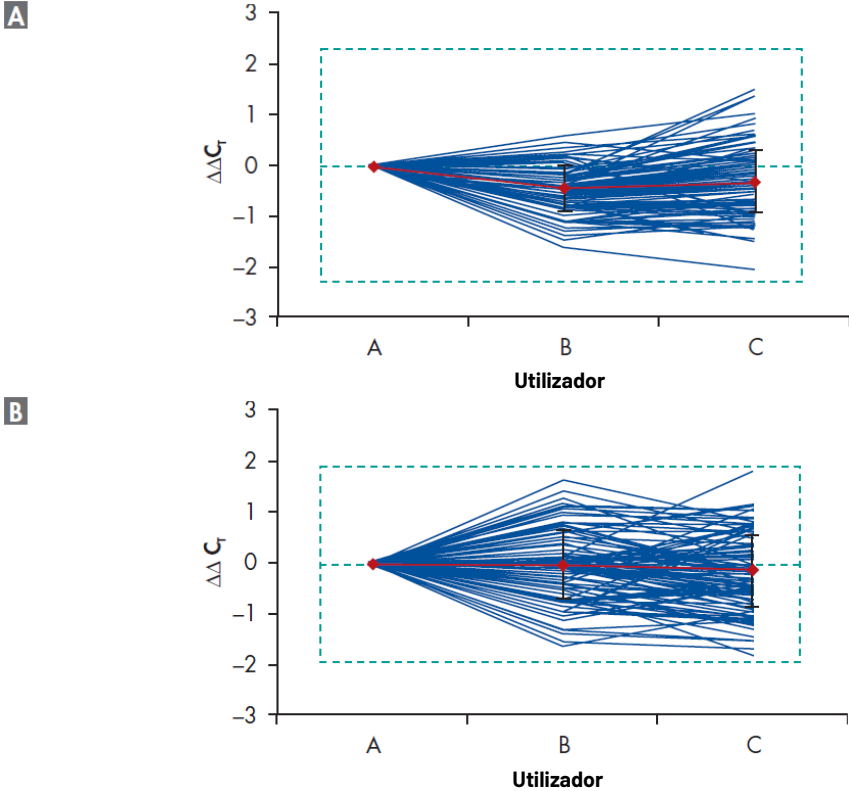
**Tabela 1C: Reprodutibilidade em cada lote e entre todos os utilizadores para os pools de dadores selecionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Pool de dadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	7,96	0,69	9	9,88	1,34	14
Lote 2, todos os utilizadores	6,76	0,93	14	9,99	1,84	18
Lote 3, todos os utilizadores	7,60	1,27	17	9,09	1,71	19
	Pool de dadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	8,83	1,63	19	9,02	1,27	14
Lote 2, todos os utilizadores	7,75	1,36	18	8,73	2,31	26
Lote 3, todos os utilizadores	8,46	1,99	24	9,20	1,80	20

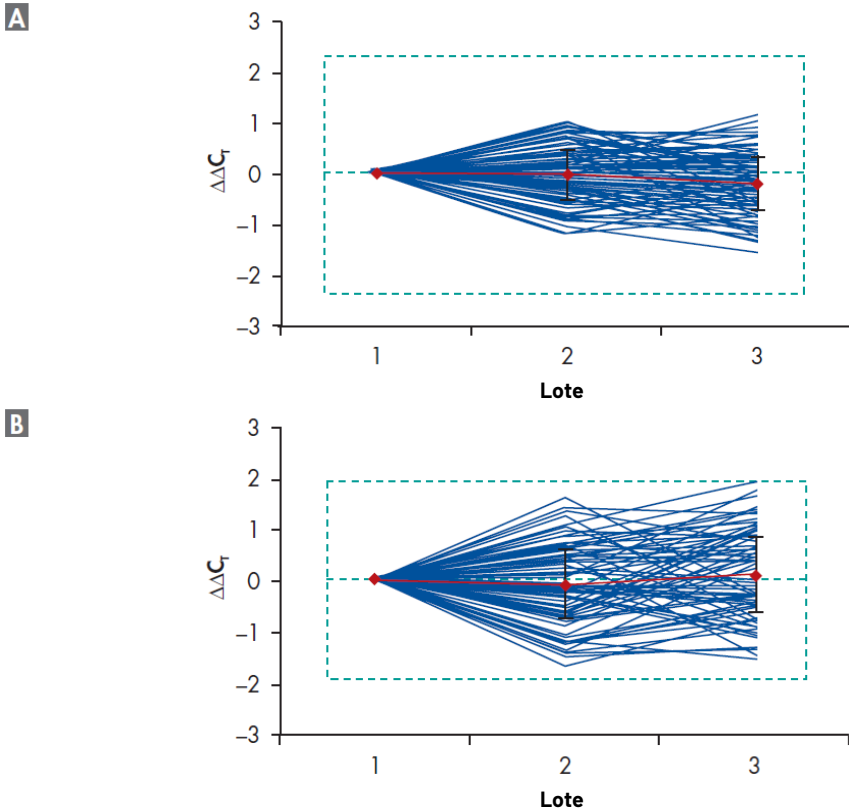
**Tabela 1D: Reprodutibilidade entre todos os lotes e todos os utilizadores para os pools de dadores selecionados (1, 6, 9, 10)**

Combinação de dados	Pool de dadores 1 ( $5,1 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 6 ( $6,5 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	7,44	1,09	15	9,66	1,65	17
	Pool de dadores 9 ( $8,4 \times 10^6$ células/ml)			Pool de dadores 10 ( $10,2 \times 10^6$ células/ml)		
	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)	Rendimento médio ( $\mu\text{g}$ )	DP ( $\mu\text{g}$ )	CV (%)
Lote 1, todos os utilizadores	8,35	1,70	20	8,99	1,80	20

Análise detalhada de 4 pools de dadores representativos. Os pools foram selecionados de acordo com a contagem de glóbulos brancos e refletem os valores superior, médio e inferior do intervalo normal das contagens de glóbulos brancos ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leucócitos/ml). A contagem de glóbulos brancos representa o valor médio de 3 contagens de glóbulos brancos dos 3 dadores por pool de dadores.



**Figura 10: Reprodutibilidade da RT-PCR – entre utilizadores.** Foi utilizada a purificação de ARN na experiência descrita na Figura 9 para a RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcrição relativos do [A] FOS e [B] IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. São traçados os valores de todas as amostras, relativos aos valores para o utilizador A (10 pools de dados × 3 lotes de kit × 4 replicações = 120 conjuntos de dados para cada gene) com desvios médios (linhas vermelhas) e desvios-padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3x$  dos ensaios (FOS: 2,34  $C_T$ ; IL1B: 1,93  $C_T$ ).



**Figura 11: Reprodutibilidade de RT-PCR – entre lotes de kit.** Foi utilizada a purificação de ARN na experiência descrita na Figura 9 para a RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcrição relativos do [A] FOS e [B] IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. São traçados os valores de todas as amostras, relativos aos valores para o lote 1 do kit (10 pools de dados × 3 utilizadores × 4 replicações = 120 conjuntos de dados para cada gene) com desvios médios (linhas vermelhas) e desvios-padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total ±3x dos ensaios (FOS: 2,34 C<sub>T</sub>; IL1B: 1,93 C<sub>T</sub>).

Tabela 2: Resumo dos dados da RT-PCR da Figura 10 e da Figura 11

Sistema de teste	Ensaio FOS/18S ARNr		Ensaio IL1B/18S ARNr	
Comparação de dados	Média ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ DP ( $\Delta\Delta C_T$ )	Média ( $\Delta\Delta C_T$ )	$\pm$ DP ( $\Delta\Delta C_T$ )
<b>Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes</b>				
Todos os utilizadores, lote 1-lote 1	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os utilizadores, lote 1-lote 2	-0,03	0,48	-0,07	0,66
Todos os utilizadores, lote 1-lote 3	-0,21	0,52	0,11	0,71
<b>Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes</b>				
Todos os lotes, utilizador A-utilizador A	0,00	0,00	0,00	0,00
Todos os lotes, utilizador A-utilizador B	-0,46	0,44	-0,06	0,69
Todos os lotes, utilizador A-utilizador C	-0,31	0,60	-0,15	0,71

Utilizador: técnico, efetuou o estudo.

Lote: número do lote do kit utilizado neste estudo.

DP: Desvio-padrão.

Mostram-se os valores  $\Delta\Delta C_T$  médios (N=120) e os desvios-padrão para os dados apresentados na Figura 10 e na Figura 11.

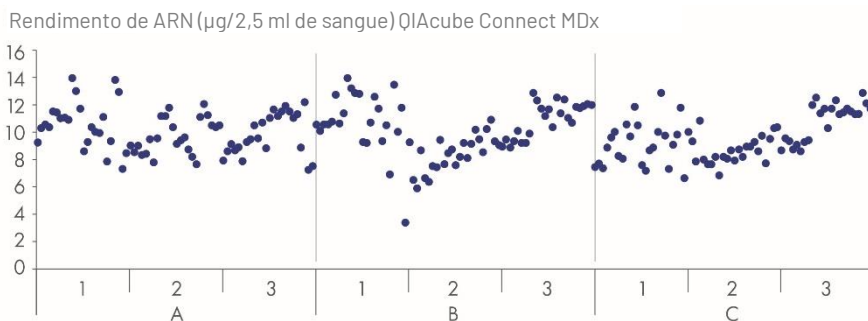
## Isolamento automatizado de ARN

Os rendimentos de ARN de 2,5 ml de sangue total humano saudável são  $\geq 3 \mu\text{g}$  para  $\geq 95\%$  das amostras processadas. Na Figura 12 (página 57) são indicados os rendimentos de ARN de um total de 216 amostras preparadas utilizando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 técnicos. Dado que para estes estudos se utilizaram amostras de sangue em pools em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais, os resultados não refletem o rendimento de ARN esperado com amostras individuais de colheitas de sangue individuais. Dado que os rendimentos são altamente dependentes do dador, os rendimentos individuais podem variar (Figura 12, página 57).

Pelo menos 95% das amostras não apresentam qualquer inibição em RT-PCR quando o eluato representa 30% do volume de reação de RT-PCR. Utilizando o protocolo automatizado, a contaminação cruzada entre amostras é indetetável, conforme determinado por RT-PCR quantitativa em tempo real de sequências de ABL1 e transcrições de FOS em amostras negativas para ARN (água) emparelhadas com amostras positivas para ARN (sangue total humano) no mesmo ensaio.

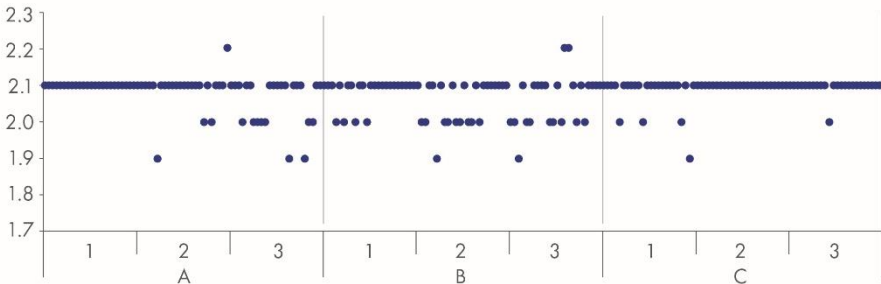


O ARN isolado com o PAXgene Blood RNA System e o protocolo automatizado apresentam pureza, conforme demonstrado por ausência de inibição na RT-PCR e pelos valores de  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,2. A quantidade de ADN genômico presente é  $\leq 1\%$  (p/p) numa quantidade  $\geq 95\%$  de todas as amostras, conforme determinado por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene da beta-actina. Na Figura 13 e na Figura 14 (página 58) mostram-se os valores de  $A_{260}/A_{280}$  e o ADN genômico relativo de um total de 216 amostras preparadas utilizando o protocolo automatizado com três lotes de kit por três técnicos.



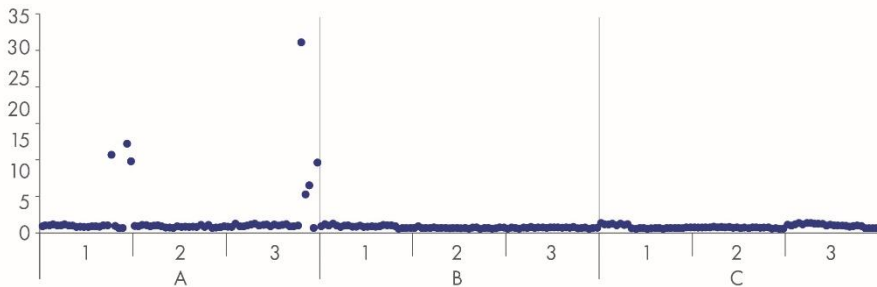
**Figura 12: Rendimento de ARN – processamento automatizado com o QIAcube Connect MDx.** As amostras de sangue de doadores individuais foram colhidas em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). O conteúdo dos tubos foi agrupado em 6 pools de doadores e novamente dividido. Foi processado um total de 216 tubos (ou seja, 36 por pool) por três técnicos diferentes (A, B, C). Cada técnico utilizou 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit para o isolamento automatizado com o QIAcube Connect MDx e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 6 pools de doadores. Mostram-se os rendimentos de ARN de todas as amostras individuais para cada combinação técnico/lote.

Pureza do ARN ( $A_{260}/A_{280}$ ) QIAcube Connect MDx



**Figura 13: Pureza do ARN (valores de  $A_{260}/A_{280}$ ) – processamento automatizado com o QIAcube Connect MDx.** O ARN foi purificado por três técnicos diferentes (A, B, C) utilizando três lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com o QIAcube Connect MDx na experiência descrita na Figura 12. São apresentados os valores de  $A_{260}/A_{280}$  de todas as amostras individuais para cada combinação técnico/lote.

ADN genômico (p/p) [%] QIAcube Connect MDx



**Figura 14: Pureza do ARN (% de contaminação do ADN genômico) – processamento automatizado com o QIAcube Connect MDx.** O ARN foi purificado por três técnicos diferentes (A, B, C) utilizando três lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com o QIAcube Connect MDx na experiência descrita na Figura 12. Mostram-se os valores de ADN genômico (p/p) em todas as amostras individuais para cada combinação técnico/lote.

O protocolo automatizado de isolamento de ARN utilizando o PAXgene Blood RNA System produz resultados de RT-PCR altamente reprodutíveis e repetíveis, tornando-o altamente robusto para testes diagnósticos clínicos.

## Estabilidade do ARN isolado

As amostras de ARN isolado a partir de PAXgene Blood RNA Tubes cheios de sangue com o PAXgene Blood RNA Kit permanecem estáveis durante 5 anos a  $-20^{\circ}\text{C}$  e durante sete anos a  $-70^{\circ}\text{C}$  (ponto final dos estudos).

# Notas importantes

## Utilizar o QIAcube Connect MDx

Assegure-se de que está familiarizado com o funcionamento do QIAcube Connect MDx. Leia o Manual do utilizador e todas as informações adicionais fornecidas com o instrumento, prestando especial atenção às informações de segurança, antes de dar início ao protocolo automatizado do PAXgene Blood RNA.

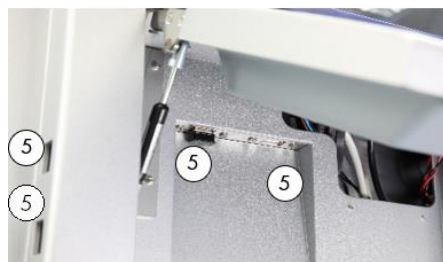
## Iniciar o QIAcube Connect MDx

Feche a cobertura do QIAcube Connect MDx e ligue o instrumento através do interruptor de alimentação (consulte a Figura 15, página 61).

É emitido um sinal sonoro e apresentado o ecrã de arranque. O instrumento efetua automaticamente testes de inicialização.



Vista frontal do QIAcube Connect MDx



Ecrã tátil extraído



Vista traseira do QIAcube Connect MDx (lado esquerdo)



Vista traseira do QIAcube Connect MDx (lado direito)

Figura 15: Características externas do QIAcube Connect MDx.

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>① Ecrã tátil</li> <li>② Cobertura</li> <li>③ Gaveta de resíduos</li> <li>④ Interruptor de alimentação</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>⑤ 2 portas USB no lado esquerdo do ecrã tátil;<br/>2 portas USB atrás do ecrã tátil (módulo<br/>Wi-Fi ligado a 1 porta USB)</li> <li>⑥ Porta Ethernet RJ-45</li> <li>⑦ Tomada do cabo de alimentação</li> <li>⑧ Saída de ar de arrefecimento</li> </ul> |
|---|--|

## Ecrã tátil

O QIAcube Connect MDx é controlado utilizando um ecrã tátil. O ecrã tátil permite ao utilizador operar o instrumento e orientar o utilizador através da configuração da mesa de trabalho. Durante o processamento de amostras, o ecrã tátil mostra o estado do protocolo e o tempo restante.




Figura 16: Ecrã tátil extraído do QIAcube Connect MDx.


## Instalar protocolos no QIAcube Connect MDx

Pode ser necessária uma instalação de protocolos inicial antes de se possa efetuar a primeira preparação de ARN no QIAcube Connect MDx. Instale os protocolos "PAXgene Blood RNA Part A" e "PAXgene Blood RNA Part B".

Os protocolos para o QIAcube Connect MDx são fornecidos em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) e é necessário transferi-los para a pen USB fornecida com o instrumento. Estes protocolos serão transferidos para o instrumento através da porta USB.

A porta USB (localizada na lateral do ecrã tátil; consulte a Figura 15, página 61) permite a ligação do QIAcube Connect MDx à pen USB fornecida com o instrumento. Os ficheiros de dados, tais como ficheiros de registo ou ficheiros de relatório, também podem ser transferidos pela porta USB do instrumento para a pen USB.

 A porta USB destina-se apenas a ser utilizada com a pen USB fornecida pela QIAGEN. Não ligue outros dispositivos a esta porta.

 Não retire a pen USB enquanto estiverem a ser descarregados protocolos ou transferidos ficheiros de dados, nem durante um ensaio de protocolo.


Para obter mais detalhes sobre o processo de carregamento de protocolos para o QIAcube Connect MDx, consulte o manual do utilizador do instrumento.


## Carregar o QIAcube Connect MDx

Para poupar tempo, o carregamento pode ser efetuado durante um ou ambos os passos de centrifugação de 10 min (passos 3 e 5) em "Protocolo: Isolamento automatizado do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", página 33.

### Frascos de reagente

Antes de cada ensaio no QIAcube Connect MDx, encha cuidadosamente os 4 frascos de reagente com os reagentes listados na Tabela 3 (página 64) até ao nível máximo do indicador ou, se isso não for possível, até ao nível permitido pelos volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule claramente os frascos e as tampas com os nomes de tampão e coloque os frascos de reagente cheios nas posições adequadas no respetivo suporte. Carregue o suporte na mesa de trabalho, conforme demonstrado (Figura 17 e Figura 18, páginas 64 e 65, respetivamente).

 O volume de tampão BR2 fornecido não irá encher o frasco de reagente até ao nível do indicador. Os tampões BR3 e BR4 não irão encher o frasco até ao nível do indicador após o processamento de várias amostras nos ensaios anteriores.

 Certifique-se de que retira as tampas dos frascos antes de os colocar na mesa de trabalho.



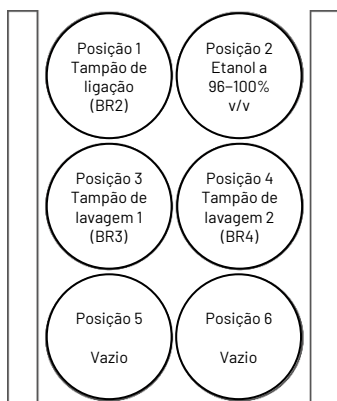
Os volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit (50) são suficientes para um máximo de 7 ensaios de preparação de ARN no QIAcube Connect MDx e cada ensaio pode ter entre 2 a 12 amostras. No geral, devem ser evitadas execuções com um pequeno número de amostras por execução, de modo a executar um total de 50 amostras por kit. Mais de 7 ensaios de preparação de ARN podem originar volumes de tampão insuficientes para o processamento das últimas amostras.

**Tabela 3: Posições no suporte de frascos de reagente**

Posição	Reagente
1	Tampão de ligação (BR2)
2	Etanol (96–100% v/v)
3	Tampão de lavagem 1 (BR3)
4	Tampão de lavagem 2 (BR4)*
5	– (deixar vazio)
6	– (deixar vazio)

\* O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100% v/v, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

**A**



**B**



**Figura 17: Carregar o suporte de frascos de reagente.** [A] Posições esquemáticas e conteúdo dos frascos no suporte de frascos de reagente. [B] Carregar o suporte no QIAcube Connect MDx.



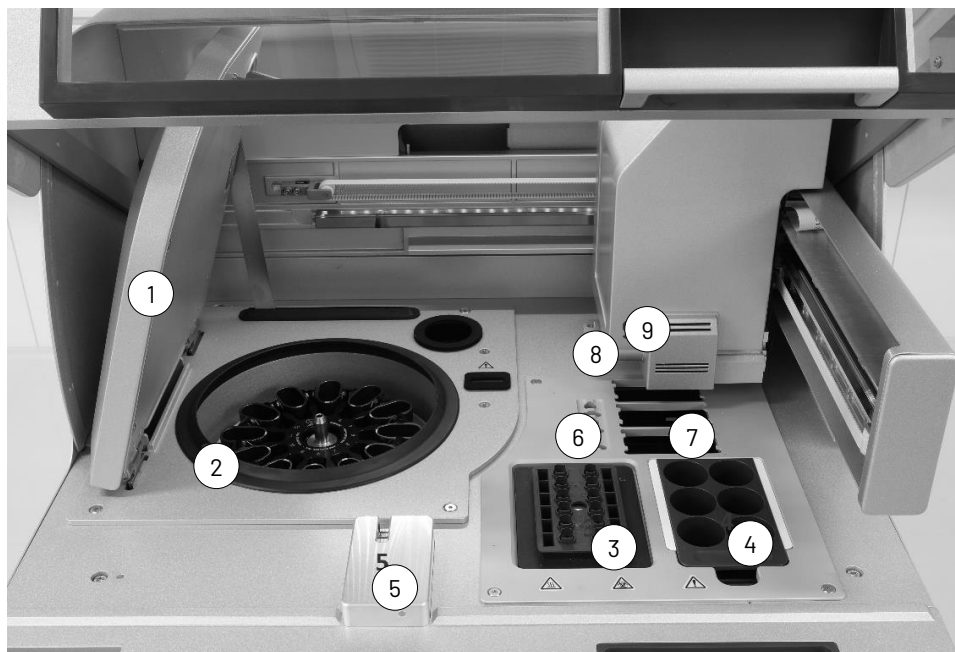


Figura 18: Vista interna do QIAcube Connect MDx.

- |   |   |   |  |
|---|---|---|--|
| ① | Tampa da centrífuga                       | ⑥ | Ranhuras de MCT  |
| ② | Centrífuga                                | ⑦ | 3 ranhuras para suportes de pontas   |
| ③ | Agitador                                  | ⑧ | Ranhuras de eliminação para pontas e colunas   |
| ④ | Suporte de frascos de reagente            | ⑨ | Braço robótico (inclui 1 pipetador de canal, garra, sensor óptico e ultrassônico e LED UV) |
| ⑤ | Sensor de pontas e fechadura da cobertura |   |  |

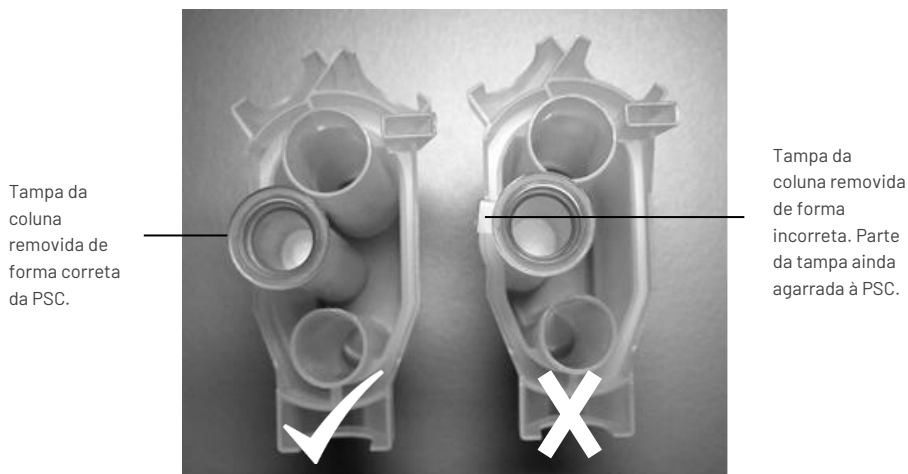
## Colunas de rotação (PSC, PRC), MCT e material de plástico do QIAcube Connect MDx

Coloque 2 suportes de pontas cheios com pontas com filtro de 1000 µl no QIAcube Connect MDx (consulte a Figura 18, página 65). Volte a encher os suportes com pontas quando for necessário.

**i** Utilize apenas pontas com filtro de 1000 µl concebidas para utilização com o QIAcube Connect MDx.

Rotule os adaptadores do rotor e os MCT para cada amostra utilizando uma caneta de tinta permanente. Abra as PSC a usar e corte totalmente as tampas utilizando uma tesoura (consulte a Figura 19).

**i** Para um funcionamento adequado da garra robótica do QIAcube Connect MDx, retire completamente (corte) as tampas e todas as peças de plástico que ligam a tampa à PSC (consulte a Figura 19). Caso contrário, a garra robótica não poderá agarrar as PSC corretamente.



**Figura 19: Carregar a PSC.** A PSC é carregada na posição central do adaptador do rotor. Cortar a tampa da PSC antes de carregar a coluna.

Carregue a PSC, (sem tampa, consulte a Figura 19, página 66), PRC e o MCT rotulado nas posições adequadas em cada adaptador do rotor rotulado, conforme demonstrado na Tabela 4 e na Figura 20.

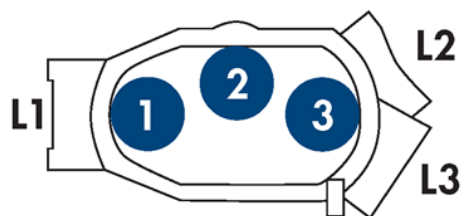


Certifique-se de que as tampas da coluna de rotação (PRC) e dos MCT são totalmente empurradas para baixo até à base das ranhuras na extremidade do adaptador do rotor. Caso contrário, as tampas irão partir-se durante a centrifugação.

**Tabela 4: Consumíveis de plástico para o adaptador do rotor**

Posição	Reagente	Posição da tampa
1	Coluna de rotação PAXgene RNA (vermelha, PRC)	L1
2	Coluna de rotação PAXgene Shredder (lilás, PSC)(corte a tampa antes de colocar no adaptador do rotor)	-
3	MCT*	L3

\* Utilize os MCT (1,5 ml) incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.



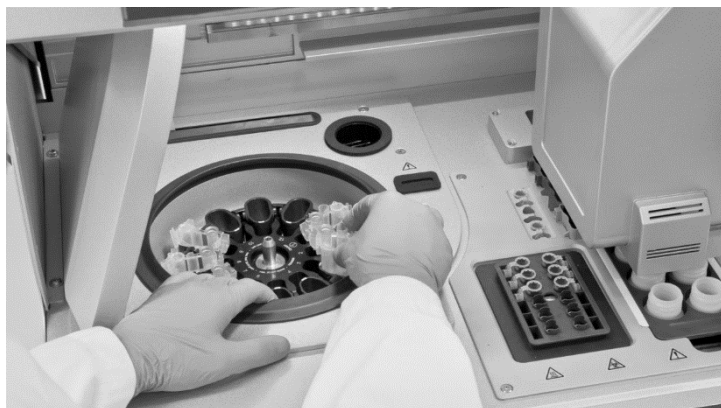
**Figura 20: Posições no adaptador do rotor.** O adaptador do rotor apresenta três posições de tubo (1-3) e três posições de tampa (L1-L3).

## Carregar a centrífuga

Carregue os adaptadores do rotor montados nos baldes da centrífuga do QIAcube Connect MDx conforme demonstrado na Figura 21 abaixo.



Se forem processadas menos de 12 amostras, certifique-se de que carrega o rotor da centrífuga equilibrado radialmente (consulte a Figura 22, página 69). Todos os baldes da centrífuga devem ser montados antes de se iniciar um ensaio do protocolo, mesmo que se pretendam processar menos de 12 amostras. Não é possível processar uma única amostra ou 11 amostras.



**Figura 21:** Carregar a centrífuga no QIAcube Connect MDx. Carregar os adaptadores do rotor montados nos baldes da centrífuga.

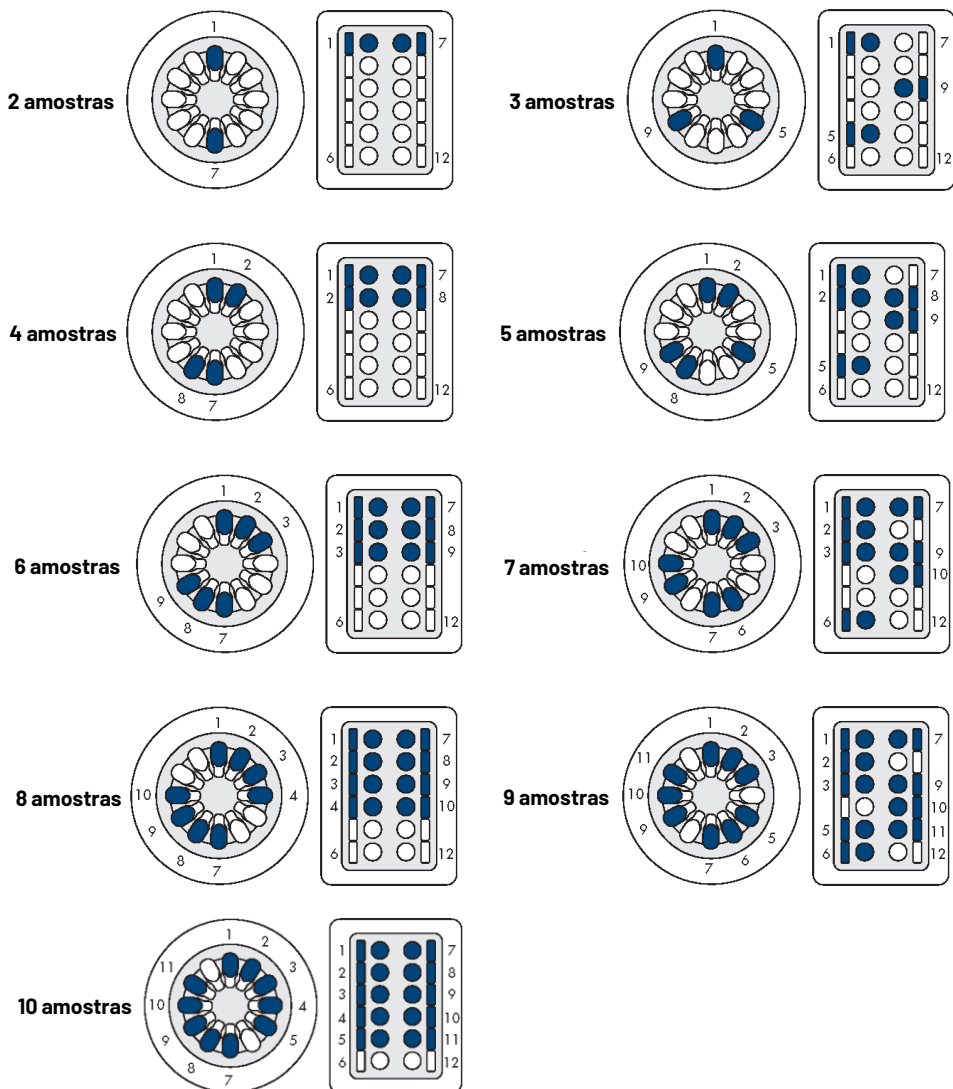


Figura 22: Carregar a centrífuga e o agitador. Mostram-se as posições da centrífuga e do agitador para processamento de duas (2) a dez (10) amostras. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Para processar 12 amostras, todas as posições da centrífuga e do agitador são carregadas (imagem não apresentada).

## Tubos de processamento

Retire os PT deixados nas ranhuras para MCT em ensaios anteriores (consulte a Figura 18, página 65). Encha três PT com a quantidade de reagentes indicada na Tabela 5, de acordo com o número de amostras do ensaio.

Para a mistura de incubação de DNase I, pipete o volume de tampão de digestão de ADN (RDD) indicado num PT e adicione o volume indicado de solução-mãe de DNase I (RNFD). Misture, pipetando suavemente a mistura completa para cima e para baixo três vezes, utilizando uma ponta de pipeta de 1000 µl.



Utilize os PT de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule claramente os tubos com os nomes dos reagentes e coloque-os na posição adequada nas ranhuras para os MCT, conforme indicado na Tabela 6 (página 71).



A DNase I (RNFD) é especialmente sensível à desnaturação física. Misture, pipetando apenas, e utilizando pontas de pipetas de diâmetro amplo para reduzir a deformação. Não agite no vórtex.

Certifique-se de que é pipetado apenas o volume necessário, conforme indicado na Tabela 5.

**Tabela 5: Volume de reagentes necessário nos PT para as ranhuras de MCT**

Número de amostras	Volume de reagente para o número indicado de amostras (µl)		
	Proteinase K (PK)	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (BR5)
2	126	187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)	313
3	170	261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)	399
4	213	334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)	486
5	256	407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)	572
6	299	481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)	658
7	342	554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)	745
8	386	627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)	831
9	429	701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)	918
10	472	775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)	1004
12	558	921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD)	1177

**Tabela 6: Ranhuras de MCT**

	Posição		
	A	B	C
Conteúdo	Proteinase K	Mistura de incubação de DNase I	Tampão de eluição (BR5)
Recipiente	Tubo de processamento*	Tubo de processamento*	Tubo de processamento*

\* Utilize os PT de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

# Eliminação

Para uma eliminação segura após a colheita de espécimes e isolamento de ARN manual, consulte as informações de segurança e precauções nas páginas 19 e 20, respectivamente.

Adicionalmente, para o isolamento de ARN automatizado, utilizando o QIAcube Connect MDx, consulte a Figura 21 e a Figura 22, páginas 68 e 69, respectivamente, que indicam as ranhuras de uso exclusivo para pontas e colunas usadas para eliminação.



# Referências

Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. Clin. Chem. 48, 1883-90.







Sambrook J and Russell D W (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

International Organization for Standardization (2019) Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre-examination processes for venous whole blood – Part 1: Isolated cellular RNA (ISO Standard No. 20186-1:2019).



Wilfinger W W, Mackey M, and Chomczynski P (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. BioTechniques 22, 474.

# Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para obter mais informações, consulte a página de perguntas frequentes no nosso Centro de apoio técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas dos Serviços de Assistência da QIAGEN estão sempre prontos a responder a qualquer questão que possa surgir sobre as informações e protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para informações de contacto, consulte o verso do manual ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

Comentários e sugestões	
<b>ARN degradado</b>	
a) Contaminação por RNase	 Tenha cuidado para não introduzir qualquer RNase nos reagentes durante o procedimento ou manipulação posterior (consulte o Apêndice A, na página 79)
<b>Baixo rendimento de RNA</b>	
b) Menos de 2,5 ml de sangue colhidos num PAXgene Blood RNA Tube (BRT)	 Certifique-se de que são colhidos 2,5 ml de sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consulte o <i>Manual do PAXgene Blood RNA Tube</i> )
c) Concentração de ARN medido em água	 O ARN deve ser diluído em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5* para uma quantificação precisa (consulte o Apêndice B, página 80).
d) Detritos celulares transferidos para a PRC nos passos 9 e 10 do protocolo manual	 Evite transferir partículas de grandes dimensões ao pipetar o sobrenadante no passo 7 do protocolo manual (a transferência de pequenos detritos não irá afetar o procedimento).
e) Sobrenadante não completamente removido no passo 3	 Certifique-se de que é removida a totalidade do sobrenadante. Se o sobrenadante for decantado, elimine gotas da borda do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) absorvendo com um toalhete de papel. Tome precauções adequadas para evitar a contaminação cruzada.
f) Depois da colheita para o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sangue é incubado durante menos de 2 h	 Incube o sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 h após a colheita.




\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Comentários e sugestões	
<b>Baixo valor de <math>A_{260}/A_{280}</math></b>	
g) Água utilizada para diluir o ARN para a medição de $A_{260}/A_{280}$	 <p>Use 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5 para diluir o ARN antes de medir a pureza* (consulte o Apêndice B, página 80).</p>
h) O espectrofotômetro não foi corretamente ajustado a zero	 <p>Ajuste o espectrofotômetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotômetro não for devidamente ajustado para zero.</p>
<b>Avaria do instrumento</b>	
i) O QIAcube Connect MDx não funcionou corretamente	<p>Leia o <i>Manual do utilizador do QIAcube Connect MDx</i>, prestando especial atenção à secção de Resolução de problemas. Certifique-se de que o instrumento é objeto de uma manutenção adequada, conforme descrito no Manual do utilizador.</p>

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474.

# Símbolos

Os seguintes símbolos poderão aparecer nas Instruções de utilização ou na embalagem e nos rótulos. Os símbolos adicionais são descritos em Conteúdo do kit (página 6).

Símbolo	Definição do símbolo
V<N1>	Versão <N1> do produto
 <N2>	Contém reagentes suficientes para <N2> testes
	Consulte as instruções de utilização
	Prazo de validade
<b>IVD</b>	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
<b>REF</b>	Número de catálogo
<b>LOT</b>	Número de lote
<b>MAT</b>	Número do material
<b>COMP</b>	Componentes
<b>NUM</b>	Número
<b>KU</b>	Unidades de Kunitz
<b>ADD</b>	Adicionar
<b>CONT</b>	Conteúdo

RCNS

Reconstituído

DNase

Desoxirribonuclease I

EtOH

Etanol

GITC

Isotiocianato de guanidina

RNase-Free DNase Set

RNase-Free DNase Set

GTIN

Número global de item comercial



Limites de temperatura



Limite superior de temperatura



Fabricante

EC REP

Representante autorizado europeu de acordo com o Regulamento (UE) 2017/746



Nota importante



Adição de etanol

CE

Marcação CE. Este produto cumpre os requisitos do Regulamento (UE) 2017/746 relativo a dispositivos médicos de diagnóstico in vitro.

UDI

Identificação única do dispositivo



Cuidado



AVISO: Superfície quente

## Informações de contacto

Na QIAGEN, orgulhamo-nos da qualidade e da disponibilidade da nossa assistência técnica. Os nossos departamentos de assistência técnica são compostos por cientistas experientes com vastos conhecimentos práticos e teóricos em biologia molecular e na utilização de produtos PreAnalytiX. Em caso de dúvidas relativamente ao PAXgene Blood RNA Kit, contacte-nos.

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de apoio técnico em **[www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support)**, ligue para 00800-22-44-6000 ou contacte um dos Departamentos dos Serviços de Assistência da QIAGEN ou distribuidores locais da QIAGEN (consulte a contracapa do manual ou visite-nos em **[www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**).

# Apêndice A: Observações genéricas sobre a manipulação do ARN

## Manipulação do ARN



As ribonucleases (RNases) são enzimas extremamente estáveis e ativas, que, habitualmente, não requerem cofatores para atuar. Dado que as RNases são difíceis de inativar, e mesmo quantidades mínimas são suficientes para destruir o ARN, não use nenhum material de plástico ou vidro sem eliminar primeiro uma possível contaminação por RNase. É necessário ter extremo cuidado para evitar introduzir acidentalmente RNases na amostra de ARN durante ou após o procedimento de isolamento. Para criar e manter um ambiente livre de RNase, devem tomar-se precauções durante o pré-tratamento e utilização de recipientes descartáveis e não descartáveis e soluções durante o trabalho com o RNA.

## Manipulação geral



Ao trabalhar com ARN, deve usar-se sempre uma técnica microbiológica asséptica adequada. As mãos e partículas de pó transportam bactérias e fungos e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Use sempre luvas de látex ou vinil para manipular os reagentes e as amostras de ARN de modo a evitar a contaminação por RNase a partir da superfície da pele ou de equipamento de laboratório com poeira. Troque frequentemente de luvas e mantenha os tubos fechados sempre que possível. Mantenha o ARN purificado em gelo quando as alíquotas forem pipetadas para aplicações a jusante.

Poderá encontrar protocolos para remoção da contaminação por RNase de artigos de vidro e soluções em guias gerais de biologia molecular, como Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Apêndice B: Quantificação e determinação da qualidade do ARN total

## Quantificação do ARN

A concentração do ARN deve ser determinada medindo a absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) num espectrofotómetro. Para garantir a significância, as leituras devem estar dentro do intervalo linear do espectrofotómetro. Uma absorvância de 1 unidade a 260 nm corresponde a 44 µg de ARN por ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \text{ µg/ml}$ ). Esta relação só é válida para medições em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5\*. Por conseguinte, se for necessário diluir a amostra de ARN, tal deve ser feito em 10 mM de Tris-HCl. Conforme discutido em baixo (consulte "Pureza do ARN", página 81), a relação entre os valores de absorvância a 260 e 280 nm fornece uma estimativa da pureza do ARN. Ao medir amostras de ARN, certifique-se de que as cuvets estão livres de RNase. Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero. Abaixo encontra-se um exemplo do cálculo envolvido na quantificação do ARN.

Volume da amostra de ARN = 80 µl  
Diluição (1/15) = 10 µl da amostra de ARN + 140 µl de 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5  
Absorvância medida da amostra diluída numa cuvete (livre de RNase).  
 $A_{260}$  = 0,3  
Concentração da amostra =  $44 \times A_{260} \times \text{fator de diluição}$   
=  $44 \times 0,3 \times 15$   
= 198 µg/ml

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas, disponibilizadas pelo fornecedor do produto.



$$\begin{aligned} \text{Rendimento total} &= \text{concentração} \times \text{volume da amostra em mililitros} \\ &= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml} \\ &= 15,8 \mu\text{g de ARN} \end{aligned}$$

## Pureza do ARN

A relação das leituras a 260 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) fornece uma estimativa da pureza do ARN no que se refere a contaminantes que são absorvidos por UV, tal como proteína. No entanto, a relação de  $A_{260}/A_{280}$  é consideravelmente influenciada pelo pH. Resultados de pH mais baixos resultam numa relação de  $A_{260}/A_{280}$  mais baixa e sensibilidade reduzida à contaminação por proteínas.\* Recomenda-se medir a absorvância em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, para a obtenção de valores precisos. O ARN puro possui uma relação de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8–2,2 em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* 22, 474.

## Apêndice C: Manipulação dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



As seguintes recomendações da BD podem ser úteis ao manipular PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter mais informações sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

### Instruções para remoção da tampa BD Hemogard

1. Segure o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) com uma mão, colocando o polegar por baixo da tampa BD Hemogard. (Para maior estabilidade, coloque o braço numa superfície fixa.) Com a outra mão, rode a tampa BD Hemogard empurrando simultaneamente para cima com o polegar da outra mão apenas até afrouxar a rolha do tubo.
2. Afaste o polegar antes de levantar a tampa. Não utilize o polegar para retirar a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Cuidado: Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiver sangue, existe perigo de exposição. Para ajudar a evitar lesões durante a remoção da tampa, é importante que o polegar usado para levantar a tampa seja retirado do contacto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) assim que a tampa BD Hemogard afrouxar.
3. Retire a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Na improvável eventualidade de a proteção de plástico se separar da rolha de borracha, não volte a colocar a tampa. Remova cuidadosamente a rolha de borracha do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## Instruções para a introdução da tampa secundária BD Hemogard

1. Substitua a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Rode e empurre firmemente para baixo até que a rolha fique completamente encaixada. A reintrodução total da rolha é necessária para que a tampa se mantenha firmemente presa no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante a manipulação.

# Informações para encomendas

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
PAXgene Blood RNA Kit (50)	50 PAXgene Spin Columns, 50 Shredder Spin Columns, tubos de processamento, DNase I livre de RNase e tampões e reagentes livres de RNase. A utilizar em conjunto com os PAXgene Blood RNA Tubes	762174
PAXgene Blood RNA Tubes (100)	100 tubos de colheita de sangue	762165
<b>Produtos relacionados que podem ser encomendados à QIAGEN para o isolamento de ARN no QIAcube</b>		
Starter Pack, QIAcube	O pacote inclui: suportes de frascos de reagente (3); tiras para rotulagem de suportes (8); pontas com filtro de 200 µl (1024); pontas com filtro de 1000 µl (1024); pontas com filtro de 1000 µl, diâmetro amplo (1024); frascos de reagente de 30 ml (18); adaptadores do rotor (240); suporte para o adaptador do rotor	990395
Filter-Tips, 1000 µL (1024)	Pontas com filtro descartáveis esterilizadas, em suporte	990352
Reagent Bottles, 30 mL (6)	Frascos de reagente (30 ml) com tampas; embalagem de 6; para utilização com o suporte de frascos de reagente QIAcube	990393
Rotor Adapters (10 × 24)	Para 240 preparações: 240 adaptadores do rotor descartáveis; para utilização com o QIAcube	990394
Reagent Bottle Rack	Suporte com capacidade para 6 frascos de reagente de 30 ml na mesa de trabalho do QIAcube	9026197
Rotor Adapter Holder	Suporte para 12 adaptadores de rotor descartáveis; para utilização com o QIAcube	990392

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
<b>Produtos relacionados que podem ser encomendados à BD para colheita de sangue com PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)*</b>		
BD Vacutainer® Safety Lok™ Blood Collection Set	Agulha de calibre 21G, 0,8 × 19 mm, tubagem de 305 mm com adaptador luer; 50 por caixa, 200 por embalagem	367286/367281
BD Vacutainer® Push Button Blood Collection Set	Agulha de calibre 21G, 0,8 × 19 mm, tubagem de 305 mm com adaptador luer. 50 por caixa, 200 por embalagem	367344
BD Vacutainer One-Use Holder	Embalagem apenas para 13 mm e 16 mm de diâmetro; 1000 por embalagem	364815
BD Vacutainer Plus Serum Tubes	13 × 75 mm, 4,0 ml de colheita com tampa BD Hemogard vermelha e rótulo de papel; 100 por caixa, 1000 por embalagem	368975/367812
BD Vacutainer EST Tube	13 × 75 mm 3,0 ml de colheita com tampa BD Hemogard transparente e rótulo semitransparente; 100 por caixa, 1000 por embalagem	362725
BD Vacutainer No Additive (Z) Tube	13 × 75 mm, 3,0 ml de colheita com tampa BD Hemogard transparente e rótulo de papel; 100 por caixa, 1000 por embalagem	366703

\* Estes acessórios para colheita de sangue representam produtos típicos que podem ser utilizados com os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Para mais informações sobre estes acessórios, incluindo informações para encomendas, visite [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

## Histórico de revisões do documento

Data	Alterações
[R1] Abril de 2022	Primeira edição IVDR
[R2] Fevereiro de 2023	Endereço postal da PreAnalytiX GmbH alterado de "Feldbachstrasse" para "Garstligweg 8". Adição de produtos BD em Informações para encomendas. Atualização das Informações de segurança

## Notas



Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidades específicas do produto, consulte o manual do utilizador ou o manual do kit PreAnalytiX ou QIAGEN respetivo. Os manuais do utilizador e os manuais dos kits PreAnalytiX e QIAGEN estão disponíveis em [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) e [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados aos Serviços de Assistência da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

**Better samples  
More to explore**

 **PreAnalytiX**  
A QIAGEN / BD Company

Explore mais em: [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

HB-3009-002 02/2023