

Agosto 2015

Scheda del protocollo QIASymphony[®] SP

Tissue_LC_200_V7_DSP e Tissue_HC_200_V7_DSP
(convalidato dall'utente per il kit QIASymphony DSP
DNA Mini)

Questo documento è la scheda del protocollo *Tissue_LC_200_V7_DSP* e *Tissue_HC_200_V7_DSP*
(convalidato dall'utente per il kit QIASymphony DSP DNA Mini) QIASymphony SP, R1, per il kit
versione 1.

Informazioni generali

Questi protocolli sono studiati per l'estrazione del DNA totale da colture cellulari e colture batteriche utilizzando il QIASymphony SP e il kit QIASymphony DSP DNA Mini.

Si consiglia di utilizzare il protocollo a basso contenuto (LC) o ad alto contenuto (HC) a seconda del tipo di campione. Le colture cellulari e le colture batteriche offrono maggiori rese di DNA se processate con il protocollo ad alto contenuto, ma se è necessaria un'alta concentrazione di DNA, è possibile utilizzare il protocollo a basso contenuto in combinazione con un ridotto volume di eluizione (50 µl).

Il kit QIASymphony DSP DNA Mini, utilizzato in combinazione con i protocolli Tissue_LC_200_V7_DSP e Tissue_HC_200_V7_DSP (convalidati dall'utente per il kit QIASymphony DSP DNA Mini) per l'estrazione del DNA totale da colture cellulari e colture batteriche, è destinato ad applicazioni di biologia molecolare. Il prodotto non è destinato alla diagnosi, alla prevenzione o al trattamento di malattie.

Nota: è responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni utilizzando questa combinazione per qualunque procedura utilizzata in laboratorio.

Protocollo a basso contenuto

Kit	QIASymphony DSP DNA Mini Kit (cat. n. 937236)
Campioni	Colture cellulari e colture batteriche Quantità di campione massima raccomandata: Per coltura cellulare, 5×10^6 cellule Per coltura batterica, 1×10^9 cellule
Nome del protocollo	Tissue_LC_200_V7_DSP
Set di controllo del test predefinito	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
Volume di eluizione	50 µl, 100 µl, 200 µl o 400 µl
Versione del software necessaria	Versione 4.0

Protocollo ad alto contenuto

Kit	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit (cat. n. 937236)
Campioni	Colture cellulari e colture batteriche Quantità di campione massima raccomandata: Per coltura cellulare, 1×10^7 cellule Per coltura batterica, 4×10^9 cellule
Nome del protocollo	Tissue_HC_200_V7_DSP
Set di controllo del test predefinito	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
Volume di eluizione	100 μ l, 200 μ l o 400 μ l
Versione del software necessaria	Versione 4.0

Materiale necessario ma non in dotazione

Per tutti i tipi di campioni

- Per ridurre al minimo il contenuto di RNA: RNasi A (soluzione madre di 100 mg/ml) (cat. n. 19101)

Per batteri gram-negativi

- Tampone ATL (cat. n. 19076)

Per batteri gram-positivi

- Tampone P1 (cat. n. 19051)
- Liozima (soluzione madre di 100 mg/ml)

Per colture cellulari

- Tampone P1 (cat. n. 19051)

Cassetto "Sample" (Campione)

Tipo di campione	Colture cellulari e colture batteriche
Volume d'ingresso del campione	220 µl (necessario per campione, per protocollo)*
Volume di campione processato	200 µl
Provette per campioni primarie	n/a
Provette per campioni secondarie	Per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
Inseri	Dipendono dal tipo di provetta per campioni utilizzata; per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .

* Il sistema non riconosce né per il protocollo ad alto contenuto né per il protocollo a basso contenuto se il volume del campione è inferiore a 220 µl perché il trasferimento del campione viene effettuato senza rilevamento del livello del liquido. Occorre pertanto accertarsi che il volume d'ingresso del campione sia 220 µl.

n/a = non applicabile

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

Posizione A1 e/o A2	Cartuccia reagenti
Posizione B1	n/a
Supporto per rack per puntali 1–17	Puntali con filtro monouso, 200 µl o 1500 µl
Supporto per box unitari 1–4	Box unitari contenenti cartucce per la preparazione dei campioni o coperchi per 8 barre

n/a = non applicabile

Cassetto "Waste" (Materiali di scarto)

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

Cassetto "Eluate" (Eluati)

Rack per eluizione (si consiglia di utilizzare lo slot 1, posizione di raffreddamento)	Per maggiori informazioni consultare www.qiagen.com/goto/dsphandbooks .
---	---

Plastiche occorrente

Plastiche	Un batch, 24 campioni*	Due batch, 48 campioni*	Tre batch, 72 campioni*	Quattro batch, 96 campioni*
Puntali con filtro monouso, 200 µl†	26	50	74	98
Puntali con filtro monouso, 1.500 µl†	72	136	200	264
Cartucce per la preparazione dei campioni§	21	42	63	84
Coperchi per 8 barre¶	3	6	9	12

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

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

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

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

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

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

Volume di eluizione

Il volume di eluizione viene selezionato sul touch screen. In base al tipo di campione e al contenuto di DNA, il volume di eluato finale può variare di ben 15 µl in meno rispetto al volume selezionato. Data la possibile variazione del volume di eluato, si consiglia di controllare l'effettivo volume di eluato quando si utilizza un sistema automatizzato di setup del test che non verifica il volume di eluato prima del trasferimento. L'eluizione in volumi inferiori aumenta la concentrazione finale di DNA, ma riduce leggermente la resa. Si consiglia di utilizzare un volume di eluizione adeguato alla prevista applicazione a valle.

Preparazione dei campioni

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

Note importanti prima di iniziare

- Le particelle magnetiche del QIAasympyony eseguono la procedura di purificazione sia sull'RNA che sul DNA se entrambi sono presenti nel campione. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere RNasi A al campione nella fase indicata nel rispettivo protocollo di pretrattamento.

Ulteriori accorgimenti prima di iniziare

- Se si utilizza tampone ATL, controllare che non contenga un precipitato bianco. Se necessario, incubare per 30 minuti a 37°C agitando di tanto in tanto per sciogliere il precipitato.
- Impostare un ThermoMixer® o un agitatore-incubatore alla temperatura necessaria per il rispettivo pretrattamento.*

Colture cellulari

Possono essere utilizzate sia colture cellulari fresche che congelate. Si consiglia di utilizzare il protocollo ad alto contenuto per un numero di cellule fino a 1×10^7 . Il protocollo a basso contenuto produce una resa inferiore di DNA ed è consigliato solo in combinazione con un ridotto volume di eluizione (50 µl) se è necessaria un'alta concentrazione di DNA. Le colture cellulari congelate devono essere risospese con il tampone P1 come descritto nel protocollo di pretrattamento.

Protocollo di pretrattamento per colture cellulari

1. Centrifugare 1×10^7 cellule a $300 \times g$ per 5 minuti a temperatura ambiente (15–25°C).
Rimuovere e gettare il supernatante, prestando attenzione a non interferire con il precipitato cellulare.
Nota: Il precipitato cellulare può essere conservato a –20°C o –70°C per utilizzo futuro oppure può essere usato immediatamente.
2. Risospesare il precipitato in 220 µl di tampone P1 e trasferire il campione in una provetta per microcentrifuga da 2 ml (non fornita).
3. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare picchiando la provetta.

Nota: Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIAasympyony DSP DNA Mini.

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati periodicamente secondo le disposizioni del produttore.

- Collocare la provetta in un ThermoMixer o agitatore-incubatore e incubare a 56°C agitando alla velocità di 900 giri/min da 30 minuti a 2 ore.

Nota: Il tempo di lisi dipende dal tipo e dalla quantità di cellule. Se dopo 2 ore la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile o di lisati altamente viscosi, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 6. Si può prevedere una lisi della durata di un'intera notte, in quanto non influenza la preparazione.

- Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 4 µl di RNasi A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente (15–25°C) prima di continuare con la fase 6.
- Trasferire con cautela 220 µl del lisato in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIAasymphony SP.

Nota: Se i lisati contengono materiale non digerito, centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente prima di trasferire il supernatante nelle provette per campioni. Per un elenco completo delle provette per campioni compatibili, visitare il sito www.qiagen.com/goto/dsphanbooks. Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt® cat. n. 72.693 o 72.608).

Batteri

Possono essere utilizzate sia colture batteriche fresche che congelate. Si consiglia di utilizzare il protocollo ad alto contenuto per un numero di cellule fino a 4×10^9 . Il protocollo a basso contenuto produce una resa inferiore di DNA ed è consigliato solo in combinazione con un ridotto volume di eluizione (50 µl) se è necessaria un'alta concentrazione di DNA. La crescita batterica viene solitamente misurata come assorbanza della coltura batterica utilizzando uno spettrofotometro. Tuttavia, le letture dell'assorbanza dipendono notevolmente dal tipo di spettrofotometro utilizzato e dalle specie batteriche misurate. Si consiglia, pertanto, di tarare lo spettrofotometro mediante correlazioni fra i valori di assorbanza misurati e le quantità di cellule batteriche. I precipitati congelati devono essere risospesi con il tampone P1 (batteri gram-positivi) o con il tampone ATL (batteri gram-negativi), come descritto nei protocolli di pretrattamento.

Protocollo di pretrattamento per batteri gram-negativi

- Raccogliere al massimo 4×10^9 cellule mediante centrifugazione per 10 minuti a $5.000 \times g$ a temperatura ambiente (15–25°C). Rimuovere e gettare il supernatante, prestando attenzione a non interferire con il precipitato batterico.

Nota: Il precipitato può essere conservato a –20°C o –70°C per utilizzo futuro oppure può essere usato immediatamente.

2. Risospendere il precipitato batterico in 220 µl di tampone ATL e trasferire il campione in una provetta per microcentrifuga da 2 ml (non fornita).

3. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare picchiando la provetta.

Nota: Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIAasympyony DSP DNA Mini.

4. Collocare la provetta in un ThermoMixer o agitatore-incubatore e incubare a 56°C agitando alla velocità di 900 giri/min da 30 minuti a 2 ore.

Nota: Il tempo di lisi dipende dal tipo e dalla quantità di cellule. Se dopo 2 ore la lisi è ancora incompleta, come indicato dalla presenza di materiale insolubile o di lisati altamente viscosi, è possibile prolungare il tempo di lisi oppure rimuovere il materiale insolubile per centrifugazione come descritto nella fase 6.

5. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 4 µl di RNasi A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 6.

6. Trasferire con cautela 220 µl del lisato in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIAasympyony SP.

Nota: Se i lisati contengono materiale non digerito, centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente prima di trasferire il supernatante nelle provette per campioni.

Per un elenco completo delle provette per campioni compatibili, visitare il sito

www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt cat. n. 72.693 o 72.608).

Protocollo di pretrattamento per batteri gram-positivi

1. Raccogliere al massimo 4 x 10⁹ cellule mediante centrifugazione per 10 minuti a 5.000 x g a temperatura ambiente (15–25°C). Rimuovere e gettare il supernatante, prestando attenzione a non interferire con il precipitato batterico.

Nota: Il precipitato può essere conservato a –20°C o –70°C per utilizzo futuro oppure può essere usato immediatamente.

2. Risospendere il precipitato batterico in 200 µl di tampone P1 e trasferire il campione in una provetta per microcentrifuga da 2 ml (non fornita).

3. Aggiungere 20 µl di lisozima (100 mg/ml) e miscelare picchiando la provetta.

4. Collocare la provetta in un ThermoMixer o agitatore-incubatore e incubare a 37°C agitando alla velocità di 900 giri/min da 30 minuti a 2 ore.

Nota: Il tempo di lisi dipende dal tipo e dalla quantità di cellule.

5. Aggiungere 20 µl di proteinasi K e miscelare picchiando la provetta.

Nota: Utilizzare la proteinasi K del rack per enzimi del kit QIAasympyony DSP DNA Mini.

6. Incubare a 56°C per 30 minuti agitando a 900 giri/min.

-
7. Per ridurre al minimo il contenuto di RNA nel campione, aggiungere 4 µl di RNasi A (100 mg/ml) e incubare per 2 minuti a temperatura ambiente prima di continuare con la fase 8.
 8. Trasferire con cautela 220 µl del lisato in provette per campioni che siano compatibili con il portacampioni del QIAasymphony SP.

Nota: Se i lisati contengono materiale non digerito, centrifugare a massima velocità per 2 minuti a temperatura ambiente prima di trasferire il supernatante nelle provette per campioni.

Per un elenco completo delle provette per campioni compatibili, visitare il sito

www.qiagen.com/goto/dsphandbooks. Si consiglia di utilizzare provette da 2 ml (ad es. Sarstedt cat. n. 72.693 o 72.608).

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

Marchi commerciali: QIAGEN[®], Sample to Insight[®], QIASymphony[®] (Gruppo QIAGEN); Sarstedt[®] (Sarstedt AG and Co.); ThermoMixer[®] (Eppendorf AG). I marchi, i nomi registrati ecc. utilizzati nel presente documento, anche se non contrassegnati specificamente come tali, vanno considerati protetti dalla legge. 08/2015 HB-0977-S09-001
© 2015 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

