

Instrucciones de uso (manual de uso) del QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit



50

Versión 2



Para uso diagnóstico in vitro



61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, Alemania



R1 1127632ES

Contenido

Uso previsto	4
Usuario previsto	4
Descripción y principio.....	5
Volumen de las muestras	5
Lisis de muestras.....	7
Adsorción sobre la membrana de la columna QIAamp Mini	7
Eliminación de los contaminantes residuales	7
Elución de ácidos nucleicos puros	8
Rendimiento y tamaño de los ácidos nucleicos.....	8
Descripción de los protocolos	9
Resumen y explicación	9
Materiales suministrados	10
Contenido del kit.....	10
Componentes del kit	11
Materiales necesarios pero no suministrados	12
Reactivos adicionales.....	12
Consumibles	12
Equipo	13
Advertencias y precauciones.....	14
Información de seguridad.....	14
Información para emergencias.....	15
Precauciones	15

Eliminación.....	16
Almacenamiento y manipulación de reactivos.....	17
Estabilidad en uso.....	17
Manipulación y almacenamiento de muestras.....	18
Procedimiento.....	19
Preparación de tampones y reactivos.....	26
Protocolo Breeze: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano.....	29
Protocolo clásico: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano.....	34
Control de calidad.....	39
Limitaciones.....	39
Características del rendimiento.....	40
Referencias.....	41
Guía para la resolución de problemas.....	42
Símbolos.....	45
Apéndice A: Recomendación para la separación y el almacenamiento de plasma de sangre.....	48
Apéndice B: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN.....	50
Información para pedidos.....	51
Historial de revisiones del documento.....	52

Uso previsto

El QIAamp DSP Circulating NA Kit es un sistema que utiliza la tecnología de membrana de sílice (tecnología QIAamp) para el aislamiento manual y la purificación de ADN y ARN libre circulante procedente de muestras de plasma sanguíneo humano.

El QIAamp DSP Circulating NA Kit se ha diseñado para diagnóstico *in vitro*.

Usuario previsto

Este producto está destinado a ser utilizado por usuarios profesionales, como técnicos y médicos que hayan recibido formación en técnicas de biología molecular.

Descripción y principio

El procedimiento de QIAamp DSP Circulating NA comprende 4 pasos (lisis, unión, lavado y elución) y se lleva a cabo con las columnas QIAamp Mini en el sistema QIAvac. Este sólido procedimiento ayuda a reducir al mínimo la contaminación cruzada de una muestra a otra y aumenta la seguridad del usuario al manipular muestras potencialmente infecciosas.

Este procedimiento simple es adecuado para el procesamiento simultáneo de hasta 24 muestras en menos de 2 horas.

Volumen de las muestras

Las columnas QIAamp Mini se unen a ácidos nucleicos fragmentados de tan solo 20 nt, pero el rendimiento depende del volumen de la muestra y de la concentración de los ácidos nucleicos circulantes de la muestra (por lo general, 1-100 ng/ml en plasma). El procedimiento de QIAamp DSP Circulating NA se ha optimizado para volúmenes de muestra de hasta 5 ml.

Procedimiento de
QIAamp DSP Circulating NA Kit

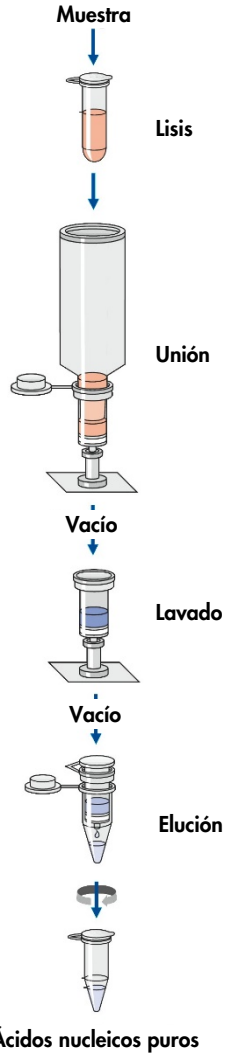


Figura 1. Descripción general del procedimiento de QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Lisis de muestras

Los ácidos nucleicos libres circulantes en los líquidos biológicos generalmente están unidos a las proteínas o envueltos en vesículas, lo que requiere un paso de lisis eficaz para poder liberar los ácidos nucleicos para la unión selectiva con la columna QIAamp Mini. Por tanto, las muestras se lisan bajo condiciones altamente desnaturalizantes a temperaturas elevadas en presencia de proteínasa K y Buffer ACL, lo que garantiza la inactivación de ADNasas y ARNasas y la liberación de ácidos nucleicos de proteínas, lípidos y vesículas unidos.

Adsorción sobre la membrana de la columna QIAamp Mini

Para permitir la unión óptima de los ácidos nucleicos circulantes con la membrana, las condiciones de unión se ajustan mediante la adición de Buffer ACB al lisado. Los lisados se transfieren a continuación a una columna QIAamp Mini y, a medida que la atraviesan por efecto de la presión de vacío, los ácidos nucleicos circulantes se adsorben de un gran volumen sobre la membrana de sílice. Las sales y el pH garantizan que la mayoría de las proteínas y otros contaminantes que pueden inhibir la PCR y otras reacciones enzimáticas anterógradas no se retengan en la membrana de la columna QIAamp Mini.

Para este protocolo se requieren un colector de vacío (p. ej., el QIAvac 24 Plus con el QIAvac Connecting System) y una bomba de vacío capaz de producir un vacío de ~800-900 mbar (p. ej., QIAGEN® Vacuum Pump). Se debe utilizar un Vacuum Regulator (parte del QIAvac Connecting System) para supervisar fácilmente la presión de vacío y la liberación conveniente de vacío.

Eliminación de los contaminantes residuales

Mientras que los ácidos nucleicos se mantienen unidos a la membrana, los contaminantes se eliminan eficazmente en tres pasos de lavado.

Elución de ácidos nucleicos puros

Para la elución se utiliza Buffer AVE. En un paso único, los ácidos nucleicos circulantes de alta pureza se eluyen en Buffer AVE equilibrado a temperatura ambiente. Se puede aplicar un volumen de elución flexible de 50-150 μl . Si se requieren concentraciones de ácido nucleico más altas, se puede reducir el volumen de elución a tan solo 20 μl . Los volúmenes de elución inferiores a 50 μl conducen a eluidos de ácidos nucleicos más concentrados pero pueden dar lugar a un rendimiento total más bajo.

El volumen del eluido puede ser hasta 5 μl menor que el volumen del tampón de elución aplicado a la columna.

Rendimiento y tamaño de los ácidos nucleicos

El rendimiento de los ácidos nucleicos libres circulantes aislados de las muestras biológicas es normalmente inferior a 1 μg y, por lo tanto, resulta difícil determinarlo con un espectrofotómetro. El rendimiento absoluto del ADN y el ARN circulantes obtenidos de una muestra con el QIAamp DSP Circulating NA Kit varía entre muestras de diferentes individuos y también depende de otros factores (p. ej., ciertos cuadros clínicos). Además, el ARN transportador presente en los ácidos nucleicos extraídos probablemente domine las lecturas de absorbancia de UV (consulte la página 27). Para la determinación de los valores se recomiendan métodos de amplificación cuantitativos.

La distribución del tamaño de los ácidos nucleicos circulantes purificados con el QIAamp DSP Circulating NA Kit puede comprobarse mediante hibridación o electroforesis en gel de agarosa en una sonda marcada específica para la diana (1) o una solución para electroforesis de microfluidos (p. ej., Agilent® Bioanalyzer).

Descripción de los protocolos

En este manual de uso se proporcionan dos protocolos diferentes.

- El "Protocolo Breeze: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano" (página 29) está destinado al procesamiento de hasta 5 ml de plasma en pasos de 1 ml y se ha optimizado para reducir el tiempo de manipulación y de respuesta.
- El "Protocolo clásico: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano" (página 34) está destinado al procesamiento de hasta 5 ml de plasma en pasos de 1 ml y constituye el protocolo sin cambios del *Manual de uso del QIAamp DSP Circulating NA Kit*, Versión 1, revisión 3 (R3).

Resumen y explicación

Los ácidos nucleicos libres circulantes suelen estar presentes en plasma humano como fragmentos cortos, <1.000 bp (ADN), <1.000 nt (ARN), o incluso de 20 nt (miARN). La concentración de ácidos nucleicos libres circulantes en plasma sanguíneo humano generalmente es baja y varía de forma considerable de un individuo a otro, ya que fluctúa en el rango de 1-100 ng/ml en las muestras humanas (2-6).

El QIAamp DSP Circulating NA Kit permite la purificación eficaz de los ácidos nucleicos circulantes de plasma humano. Las muestras pueden ser frescas o congeladas. Los tubos de extensión y el procesamiento al vacío del QIAvac 24 Plus permiten volúmenes de muestra iniciales de hasta 5 ml, y los volúmenes de elución flexibles de entre 20 y 150 µl permiten la concentración de muestras de ácidos nucleicos que se encuentran presentes en bajas concentraciones.

El ADN o ARN genómico libre circulante está listo para su uso en aplicaciones posteriores o resulta adecuado para almacenamiento. En el laboratorio, el usuario debe optimizar el plasma introducido y el volumen de elución para su analito específico y la aplicación posterior.

Materiales suministrados

Contenido del kit

QIAamp DSP Circulating NA Kit	(50)
N.º de catálogo	61504
Número de preparaciones	50

	Denominación	Símbolos	Cantidad
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Columnas QIAamp Mini con tubos de lavado) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Extensores de columna) (20 ml)	COL EXT	2 × 25
WT	Wash Tubes (Tubos de lavado) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (Tubos de elución) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Conectores VacConnector)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer* (Tampón de lisis)	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer (Tampón de unión*) (concentrado)	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (Tampón de lavado 1) (concentrado)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (Tampón de lavado 2†) (concentrado)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (Tampón de elución) (tapones púrpura)	ELU BUF	5 × 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinasa K QIAGEN)	PROTK	4 × 7 ml
Carrier	Carrier RNA (ARN transportador) (tapones rojos)	CAR RNA	310 µg
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Columnas QIAamp Mini con tubos de lavado) (WT) (2 ml)	COL	50
	Manual de uso	H B	1

* Contiene sales caótropas. Consulte la página 14 para conocer las Advertencias y precauciones.

† Contiene azida sódica como conservante.

Componentes del kit

Los componentes principales del kit se explican a continuación.

Tabla 1. Principios activos en los reactivos suministrados

Reactivo		Principio activo	Concentración
Símbolo	Nombre		
ACL	Lysis Buffer (Tampón de lisis)	Tiocianato de guanidina	de ≥ 30 a $< 50\%$ p/p
ACB	Binding Buffer (Tampón de unión) (concentrado)	Tiocianato de guanidina	de ≥ 30 a $< 50\%$ p/p
ACW1	Wash Buffer 1 (Tampón de lavado 1) (concentrado)	Clorhidrato de guanidina	de ≥ 30 a $< 60\%$ p/p
ACW2	Wash Buffer 2 (Tampón de lavado 2) (concentrado)	Ninguno	–
AVE	Elution Buffer (Tampón de elución) (tapones púrpura)	Ninguno	–
PROTK	QIAGEN Proteinase K (Proteinasa K QIAGEN)	Proteinasa K	de ≥ 1 a $< 3\%$ p/p
Carrier	Carrier RNA (ARN transportador) (tapones rojos)	Ninguno	–

Controles y calibradores

Para reducir al mínimo el riesgo de que se produzcan efectos negativos sobre los resultados diagnósticos generados tras el aislamiento del ácido nucleico, deben utilizarse controles adecuados para las aplicaciones posteriores.

Materiales necesarios pero no suministrados

Reactivos adicionales

- Etanol (96-100 %) *
- Isopropanol (100 %)
- Hielo picado (solo para el "Protocolo clásico: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano".)
- Es posible que algunas muestras requieran dilución con tampón fosfato salino [TFS]

Consumibles

- Pipetas (ajustables)
- Puntas de pipeta estériles (se recomienda usar puntas de pipeta con filtros para aerosoles para evitar la contaminación cruzada)
- Microtubos sin nucleasas de 1,5 o 2 ml
- Tubos para centrifugadora de 50 ml

* No utilice alcohol desnaturalizado, que contenga otras sustancias como metanol o metiletilcetona.

Equipo

- Baño de agua o bloque calefactor que permita incluir tubos para centrifugadora de 50 ml a una temperatura de 56 °C o 60 °C *
- Bloque calefactor o similar a 56 °C que permita incluir tubos de lavado de 2 ml (solo para el protocolo clásico) *
- Agitador vorticial
- Microcentrifugadora (con rotor para tubos de 2 ml) *
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (n.º de cat. 19413)
- QIAvac Connecting System (n.º de cat. 19419) o equivalente
- Vacuum Pump (n.º de cat. 84010 [EE. UU. y Canadá], 84000 [Japón] o 84020 [resto del mundo]) o bomba equivalente que pueda producir un vacío de –800 a –900 mbar
- Opcional: VacValves (n.º de catálogo 19408)

* Compruebe que los equipos se han revisado y calibrado según las recomendaciones del fabricante.

Advertencias y precauciones

Tenga en cuenta que puede ser necesario que tenga que consultar las normativas locales para conocer los requisitos de notificación, en relación a los sucesos graves que hayan ocurrido en relación con el dispositivo; al fabricante y a la autoridad sanitaria del país en el que resida el usuario y/o el paciente.

Para uso diagnóstico in vitro

Información de seguridad

Siempre que trabaje con productos químicos utilice una bata de laboratorio, guantes desechables y gafas de protección adecuados. Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en el práctico y compacto formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las hojas de datos SDS de todos los kits y componentes de los kits QIAGEN.

ADVERTENCIA Riesgo de lesiones personales



NO añada lejía ni soluciones ácidas directamente a los residuos de la preparación de las muestras.

Buffer ACL, Buffer ACB y el Buffer ACW1 contienen sales de guanidina, susceptibles de formar compuestos altamente reactivos cuando se combinan con lejía.

Si se derrama líquido de estos tampones, límpielo con un detergente de laboratorio adecuado y agua. Si el líquido derramado contiene microorganismos potencialmente infecciosos, limpie primero la zona afectada con agua y detergente de laboratorio y, a continuación, con hipoclorito sódico al 1 % (v/v).

- Los materiales de muestra y las muestras son potencialmente infecciosos. Deseche los residuos de muestras y ensayos conforme a los procedimientos de seguridad local.

Información para emergencias

CHEMTREC

EE. UU. y Canadá 1-800-424-9300

Fuera de EE.UU. y Canadá +1 703-527-3887

Precauciones

Las siguientes frases relativas a los riesgos y a las medidas de precaución se aplican a los componentes del QIAamp DSP Circulating NA Kit.

Buffer ACB



Contiene: tiocianato de guanidina. ¡Peligro! Nocivo en caso de ingestión. Puede ser nocivo en contacto con la piel y por inhalación. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llámese inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

Buffer ACL



Contiene: tiocianato de guanidina. ¡Peligro! Nocivo en caso de ingestión. Puede ser nocivo en contacto con la piel y por inhalación. Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos a largo plazo. En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. Llámese inmediatamente a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico.

Buffer ACW1



Contiene: clorhidrato de guanidina. ¡Advertencia! Nocivo en caso de ingestión o inhalación. Provoca irritación cutánea. Provoca irritación ocular grave. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado.

Proteinase K



Contiene: proteinasa K. ¡Peligro! Causa irritación leve de la piel. Puede provocar síntomas de alergia o asma o dificultades respiratorias en caso de inhalación. Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol. Usar guantes protectores/indumentaria protectora y protección para los ojos/la cara. Llevar equipo de protección respiratoria. En caso de exposición manifiesta o presunta: Llámese a un CENTRO DE TOXICOLOGÍA o a un médico. Transporte a la persona al exterior y manténgala en reposo en una posición cómoda para respirar. Eliminar el contenido/el recipiente en un centro de eliminación de residuos aprobado.

Eliminación

Los residuos contienen muestras y reactivos. Estos residuos pueden contener material tóxico o infeccioso y deben eliminarse adecuadamente. Consulte en la normativa local en materia de seguridad los procedimientos de eliminación adecuados.

Si desea obtener más información, consulte las hojas de datos sobre seguridad (Safety Data Sheets, SDS) correspondientes. Puede obtenerlas en línea en formato PDF en www.qiagen.com/safety, desde donde también podrá buscar, ver e imprimir las SDS de todos los kits y componentes de los kits de QIAGEN.

Almacenamiento y manipulación de reactivos

Las columnas QIAamp Mini deben almacenarse secas a una temperatura de 2-8 °C. Todos los tampones deben almacenarse a temperatura ambiente (15-25 °C). Las columnas QIAamp Mini y los tampones pueden almacenarse en estas condiciones hasta su fecha de caducidad en la caja del kit sin que presenten ninguna reducción en su rendimiento.

El ARN transportador liofilizado debe conservarse a temperatura ambiente (15-25 °C) hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del componente. El ARN transportador debe disolverse en Buffer AVE; el ARN transportador disuelto debe añadirse de inmediato a Buffer ACL tal como se describe en la página 30 para el protocolo Breeze y en la página 35 para el protocolo clásico. Esta solución debe estar recién preparada. Las porciones no utilizadas de ARN transportador disuelto en el Buffer AVE deben congelarse en alícuotas a una temperatura de -30 °C a -15 °C.

El QIAamp DSP Circulating NA Kit contiene una solución de proteinasa K lista para su uso, que se disuelve en un tampón de almacenamiento especialmente formulado. La proteinasa K es estable hasta la fecha de caducidad de la etiqueta del componente si se almacena a temperatura ambiente (15-25 °C).

Estabilidad en uso

El kit se puede utilizar durante 12 meses tras el primer uso o hasta la fecha de caducidad, lo que suceda primero.

Manipulación y almacenamiento de muestras

Manipulación y almacenamiento de sangre

Para evitar la degradación de los ácidos nucleicos libres circulantes y la liberación de ácidos nucleicos celulares, recomendamos almacenar la sangre total durante un máximo de 6 horas a una temperatura de 2-8 °C (p. ej., muestras con EDTA). Si va a utilizar tubos de recogida de sangre estabilizados, tenga en cuenta las condiciones de almacenamiento suministradas por el fabricante. Le recomendamos validar estas condiciones de almacenamiento junto con la aplicación posterior específica y la diana.

Almacenamiento y manipulación de plasma

Si se utiliza EDTA como anticoagulante, especialmente para ARN, se recomienda realizar la separación del plasma y el aislamiento del ácido nucleico inmediatamente después de la extracción de sangre. Para un almacenamiento a corto plazo, el plasma puede almacenarse hasta 24 horas a 2-8 °C.

Para un almacenamiento más prolongado, se pueden almacenar alícuotas de plasma de tubos de recogida de sangre estabilizados y no estabilizados a -20 °C o a -80 °C durante 12 meses (solamente para el ARN como diana) o a -80 °C durante 4 semanas (RNA como diana).

Almacenamiento de los ácidos nucleicos eluidos

Los ácidos nucleicos eluidos se recogen en tubos de elución de 1,5 ml (suministrados). Los ácidos nucleicos circulantes purificados pueden almacenarse hasta 24 horas a una temperatura de 2-8 °C. Para períodos de almacenamiento de más de 24 horas, se recomienda hacerlo a una temperatura comprendida entre los -30 °C y los -15 °C en el caso de aplicaciones posteriores de ADN y de -90 a -60 °C en el caso de aplicaciones posteriores de ARN.

Procedimiento

Cuestiones importantes antes de comenzar

QIAvac 24 Plus

El QIAvac 24 Plus está diseñado para un procesamiento de vacío rápido y eficaz de hasta 24 columnas de centrifugación QIAGEN en paralelo. Las muestras y las soluciones de lavado se extraen a través de las membranas de la columna mediante vacío y no mediante centrifugación, lo cual proporciona mayor velocidad y menos tiempo de manipulación en los procedimientos de purificación.

Junto con el QIAvac Connecting System, se puede utilizar el QIAvac 24 Plus como sistema de filtrado. El filtrado de la muestra se recoge en un frasco de residuos por separado.

Para obtener información sobre el mantenimiento del QIAvac 24 Plus, consulte las directrices de manipulación en el *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*.

Procesamiento de columnas QIAamp Mini en el QIAvac 24 Plus

Las columnas QIAamp Mini se procesan en el QIAvac 24 Plus mediante el uso de VacConnectors desechables y VacValves reutilizables. Las VacValves (opcionales) se insertan directamente en las ranuras luer del colector QIAvac 24 Plus y garantizan una velocidad de flujo constante, lo que facilita el procesamiento en paralelo de diferentes volúmenes de muestra. Deben utilizarse si las velocidades de flujo de las muestras difieren significativamente, para garantizar un vacío uniforme. Los VacConnectors son conectores desechables que se colocan entre las columnas QIAamp Mini y las VacValves o entre las columnas QIAamp Mini y las ranuras luer del QIAvac 24 Plus. Estos conectores impiden el contacto directo entre la columna de centrifugación y VacValve durante la purificación y, de ese modo, evitan cualquier contaminación cruzada entre las muestras. Los VacConnectors se desechan después del primer uso. Debido a los grandes volúmenes de solución utilizados, se requiere el QIAvac Connecting System (o una configuración similar con frascos para residuos) (consulte la Figura 2).

Directrices de manipulación del QIAvac 24 Plus

- Coloque siempre el QIAvac 24 Plus sobre una mesa o área de trabajo segura. Si se cae, el colector QIAvac 24 Plus puede agrietarse.
- Mantenga siempre el QIAvac 24 Plus limpio y seco. Para obtener información sobre los procedimientos de limpieza, consulte el *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*.
- Los componentes del QIAvac 24 Plus no son resistentes a ciertos disolventes (Tabla 2). Si estos disolventes de derraman sobre la unidad, enjuáguela bien con agua.
- Para garantizar un rendimiento constante, no aplique silicona ni grasa para vacío en ninguna parte del colector QIAvac 24 Plus.
- Tenga siempre precaución y use gafas protectoras al trabajar cerca de un colector de vacío bajo presión.
- Póngase en contacto con el servicio técnico o con el distribuidor local de QIAGEN para obtener información sobre piezas de repuesto o de recambio.
- La presión de vacío es la presión diferencial entre el interior del colector de vacío y la atmósfera (presión atmosférica estándar de 1013 milibares o 760 mm Hg) y se puede medir con el QIAvac Connecting System (consulte la Figura 2). Los protocolos requieren una bomba de vacío capaz de producir un vacío de -800 a -900 mbar (p. ej., QIAGEN Vacuum Pump). Deben evitarse las presiones de vacío más altas. El uso de presiones de vacío más bajas que las recomendadas puede reducir el rendimiento y la pureza del ácido nucleico y aumentar el riesgo de membranas obstruidas.

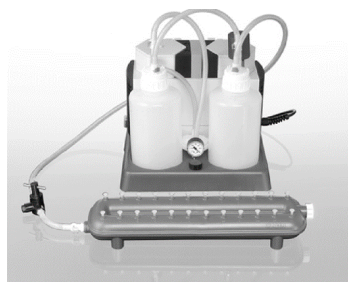


Figura 2. QIAvac 24 Plus, QIAvac Connecting System y Vacuum Pump.

Tabla 2. Propiedades de la resistencia química de QIAvac 24 Plus

Resistente a		No resistente a
Ácido acético	Sales caótropas	Benceno
Ácido crómico	Alcoholes concentrados	Fenol
SDS	Cloruro sódico	Cloroformo
Tween™ 20	Urea	Tolueno
Lejía con cloro	Ácido clorhídrico	Éteres
Hidróxido de sodio		

Montaje del QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Conecte el QIAvac 24 Plus a una fuente de vacío. Si utiliza el QIAvac Connecting System, conecte el sistema al colector y a la fuente de vacío tal como se describe en el Apéndice A del *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*.
2. Inserte una VacValve (opcional) en cada ranura luer del QIAvac 24 Plus que se va a utilizar (consulte la Figura 3). Cierre las ranuras luer con conexiones luer o cierre la VacValve insertada.

Las VacValves deben usarse si las velocidades de flujo de las muestras difieren significativamente para garantizar un vacío uniforme.

3. Inserte un VacConnector en cada VacValve (consulte la Figura 3).
Lleve a cabo este paso directamente antes de iniciar la purificación para evitar la exposición de los VacConnectors a posibles contaminantes en el aire.
4. Coloque las columnas QIAamp Mini en los VacConnectors del colector (consulte la Figura 3).
Nota: Guarde el tubo de lavado del blíster para utilizarlo en el protocolo de purificación.
5. Inserte un extensor de columna (20 ml) en cada columna QIAamp Mini (consulte la Figura 3).
Nota: Asegúrese de que el extensor de columna esté firmemente insertado en la columna QIAamp Mini a fin de evitar la fuga de la muestra.

6. Para la purificación de ácidos nucleicos, siga las instrucciones de los protocolos.

Deseche correctamente los VacConnectors después de su uso.

Deje la tapa de la columna QIAamp Mini abierta mientras aplica vacío.

Desconecte el vacío entre los pasos para garantizar que se aplique un vacío constante y uniforme durante el procesamiento. Para una liberación más rápida del vacío, debe utilizarse un Vacuum Regulator (parte del QIAvac Connecting System).

Nota: Cada VacValve puede cerrarse individualmente cuando la muestra atraviese por completo la columna de centrifugación, lo que permite un procesamiento en paralelo de muestras de diferentes volúmenes o viscosidades.

7. Después de procesar las muestras, limpie el QIAvac 24 Plus (consulte «Limpieza y descontaminación del QIAvac 24 Plus» en el *Manual de uso del QIAvac 24 Plus*).

Nota: Buffer ACL, Buffer ACB y Buffer ACW1 no son compatibles con los agentes desinfectantes que contienen lejía. Consulte la página 14 para conocer las Advertencias y precauciones.

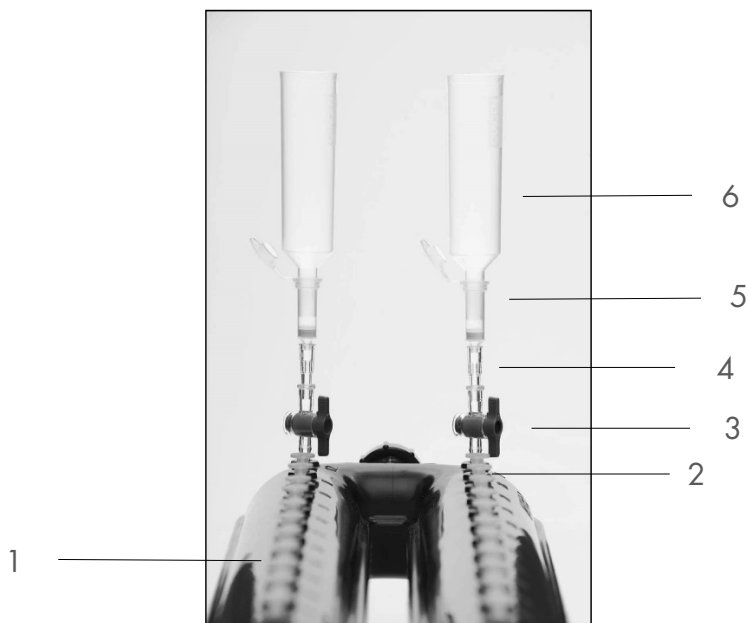
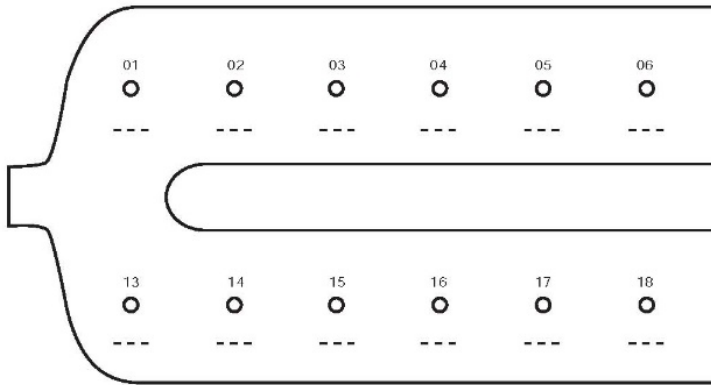


Figura 3. Montaje del QIAvac 24 Plus con columnas QIAamp Mini utilizando VacValves, VacConnectors y extensores de columna.

- | | | | |
|---|--|---|---------------------|
| 1 | QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 | VacConnector |
| 2 | Ranura luer del QIAvac 24 Plus (cerrada con conexiones luer) | 5 | Columna QIAamp Mini |
| 3 | VacValve* | 6 | Extensor de columna |

Recomendamos el etiquetado de los tubos y las columnas QIAamp Mini para usar con el sistema de vacío QIAvac 24 Plus conforme al esquema de la Figura 4 para no confundir las muestras. Esta figura se puede fotocopiar y etiquetar con los nombres de las muestras.

* Debe adquirirse por separado.



Fecha: _____

Usuario: _____

ID del ciclo: _____

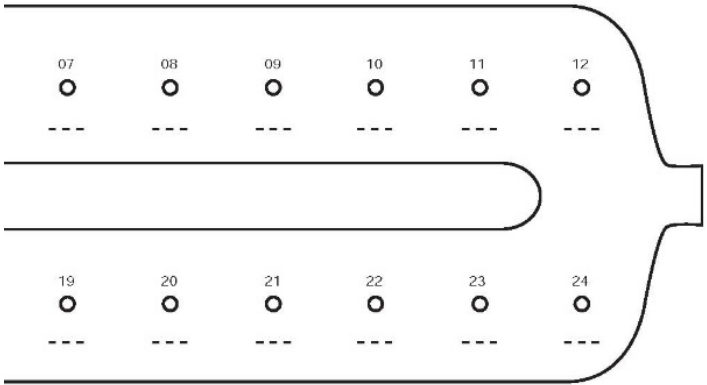


Figura 4. Esquema de etiquetado de los tubos y columnas QIAamp Mini para usar con el sistema de vacío QIAvac 24 Plus.

Preparación de tampones y reactivos

Buffer ACB

Antes de usarlo, añada 200 ml de isopropanol (100 %) a 300 ml de Buffer ACB concentrado para obtener 500 ml de Buffer ACB. Mezcle bien después de añadir isopropanol.

Buffer ACW1 *

Antes de usarlo, añada 25 ml de etanol (96-100 %) a 19 ml de Buffer ACW1 concentrado para obtener 44 ml de Buffer ACW1. Mezcle bien después de añadir etanol.

Buffer ACW2†

Antes de usarlo, añada 30 ml de etanol (96-100 %) a 13 ml de Buffer ACW2 concentrado para obtener 43 ml de Buffer ACW2. Mezcle bien después de añadir etanol.

Adición del ARN transportador al Buffer ACL*

El ARN transportador sirve para dos fines: en primer lugar, potencia la unión de los ácidos nucleicos a la membrana QIAamp Mini, especialmente si en la muestra hay pocas moléculas diana. En segundo lugar, la adición de grandes cantidades de ARN transportador reduce las posibilidades de degradación del ARN en el caso poco frecuente de que las moléculas de ARNasa no se desnaturalicen por efecto de las sales caótropas y detergentes del Buffer ACL.

La cantidad de ARN transportador liofilizado suministrado es suficiente para el volumen de Buffer ACL proporcionado con el kit. La concentración recomendada de ARN transportador se ha ajustado de modo que el protocolo QIAamp DSP Circulating NA se pueda utilizar como un sistema de purificación genérico compatible con un gran número de sistemas de amplificación y es adecuada para una amplia gama de ARN y ADN diana.

* Contiene sales caótropas. Consulte la página 14 para conocer las **Advertencias y precauciones**.

† Contiene azida sódica como conservante.

La eficacia de los diferentes sistemas de amplificación varía en función de la cantidad total de ácidos nucleicos presente en la reacción. Los eluidos del kit contienen ácidos nucleicos y ARN transportador y la cantidad de ARN transportador superará ampliamente la cantidad de ácidos nucleicos circulantes en la mayoría de los casos. Por lo tanto, la cuantificación de ácidos nucleicos circulantes aislados mediante la lectura de absorbancia de UV no será adecuada, ya que los resultados de cada medición se determinan mediante la presencia de ARN transportador.

Para obtener los niveles más altos de sensibilidad en las reacciones de amplificación, puede ser necesario reducir la cantidad de ARN transportador añadido al Buffer ACL.

Para los sistemas de amplificación que incluyen cebadores de oligonucleótido (dT), no debe añadirse ningún ARN transportador durante el aislamiento de ácidos nucleicos libres circulantes.

Añada 1550 µl de Buffer AVE* al tubo que contiene 310 µg de ARN transportador liofilizado para obtener una solución de 0,2 µg/µl de concentración. Disuelva bien el ARN transportador, repártalo en alícuotas del tamaño adecuado y guárdelas a una temperatura de -30 °C a -15 °C. No congele y descongele las alícuotas del ARN transportador repetidamente.

Nótese que el ARN transportador no se disuelve en Buffer ACL. Solo puede disolverse primero en Buffer AVE y, una vez disuelto, debe añadirse al Buffer ACL.

Calcule el volumen de mezcla de Buffer ACL-ARN transportador necesario por lote de muestras de acuerdo con las tablas de los protocolos. Seleccione el número de muestras que se van a procesar simultáneamente.

Mezcle cuidadosamente invirtiendo el tubo o el frasco diez veces. Para evitar la formación de espuma, no realice una agitación vorticial.

*Contiene azida sódica como conservante.

Nota: El procedimiento de preparación de la muestra está optimizado para un máximo de 1,0 µg de ARN transportador por muestra. Si ha comprobado que para su sistema de amplificación es preferible una cantidad menor de ARN transportador, transfiera solo la cantidad necesaria de ARN transportador disuelto a los tubos que contienen el Buffer ACL. Añada por cada microgramo de ARN transportador necesario por preparación 5 µl de ARN transportador disuelto en Buffer ACL. (El uso de menos de 1,0 µg de ARN transportador por muestra puede resultar beneficioso y debe validarse para cada tipo de muestra y de ensayo anterógrado concreto.)

Protocolo Breeze: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano

Este protocolo está indicado para la purificación de ADN y ARN circulante de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano y se ha optimizado para obtener tiempos de manipulación y respuesta más bajos. Para los flujos de trabajo validados por el usuario existentes en los que se emplee el QIAamp DSP Circulating NA Kit, versión 1/R3, consulte el «Protocolo clásico: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano» (página 34).

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Desconecte el vacío entre pasos para garantizar que se aplique un vacío constante y uniforme durante los pasos del protocolo.
Nota: La presión de la bomba de vacío debe ser de -800 a -900 mbar.
- Deje que las muestras se equilibren a temperatura ambiente.
- Use tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline, PBS) para llevar el volumen de la muestra al volumen más exacto posible (de 1 a 5 ml).
- Configure el QIAvac 24 Plus tal como se describe en la página 21.
- Caliente un baño de agua o un bloque calefactor a 56 °C para usarlos con tubos para centrifugadora de 50 ml en el paso 3.
- Deje que las columnas de centrifugación QIAamp Mini se equilibren a temperatura ambiente durante al menos 1 hora antes de usarlas.
- Asegúrese de que el Buffer ACB, el Buffer ACW1 y el Buffer ACW2 se hayan preparado (adición de isopropanol o etanol) según las instrucciones de la página 26.
- Añada ARN transportador reconstituido en Buffer AVE al Buffer ACL según las instrucciones de la Tabla 3.

Tabla 3. Volumen de Buffer ACL y ARN transportador (disuelto en Buffer AVE) necesario para procesar muestras de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano

Configuración para ml de plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Número de muestras	Buffer ACL (ml)					ARN transportador en Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procedimiento: Protocolo Breeze

1. Pipetee QIAGEN Proteinase K, plasma y Buffer ACL **en este orden** en un tubo para centrifugadora de 50 ml (no suministrado).

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

2. Cierre el tapón y mezcle mediante agitación vorticial de pulsos 5 veces durante 2 s.
Asegúrese de que se produzca un vórtice visible en el tubo. Para que la lisis sea eficaz, es esencial que la muestra y el Buffer ACL se mezclen bien hasta obtener una solución homogénea.

Nota: No interrumpa el procedimiento en este momento. Continúe de inmediato con el paso 3 para iniciar la incubación de lisis.

3. Incube a 56 °C (± 1 °C) durante 15 (± 1) min.
4. Vuelva a colocar el tubo sobre la mesa del laboratorio y desenrosque el tapón.
5. Añada Buffer ACB al lisado que se encuentra en el tubo. Elija el volumen de acuerdo con la configuración del paso 1.

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

6. Cierre el tapón y mezcle bien mediante agitación vorticial de pulsos 5 veces durante 2 s.
Asegúrese de que se produzca un vórtice visible en el tubo. Para que la lisis sea eficaz, es esencial que el lisado y el Buffer ACB se mezclen bien hasta obtener una solución homogénea.

7. Incube la mezcla de lisado-Buffer ACB en el tubo durante 5 (\pm 1) min a temperatura ambiente.
8. Inserte la columna QIAamp Mini en el VacConnector del QIAvac 24 Plus (consulte «Montaje del QIAvac 24 Plus vacuum manifold», página 21). Inserte un extensor de columna de 20 ml en la columna QIAamp Mini abierta.

Asegúrese de que el extensor de columna esté firmemente insertado en la columna QIAamp Mini para evitar la fuga de la muestra.

Nota: Mantenga el tubo de lavado para la centrifugación en seco en el paso 13.

9. Aplique con cuidado el lisado del paso 7 en el extensor de columna de la columna QIAamp Mini. Encienda la bomba de vacío. Cuando se hayan extraído por completo todos los lisados a través de las columnas, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar. Retire con cuidado el extensor de columna y deséchelo. Tenga en cuenta que los grandes volúmenes de lisado de muestra (aproximadamente 18 ml al comenzar con una muestra de 5 ml) pueden tardar hasta 20 min en atravesar la membrana QIAamp Mini mediante fuerza de vacío.

Para una liberación rápida y conveniente de la presión de vacío, debe utilizarse el Vacuum Regulator (parte del QIAvac Connecting System).

Nota: Para evitar la contaminación cruzada, tenga cuidado de no cruzar las columnas QIAamp Mini vecinas al quitar los extensores de columna.

10. Dispense 600 μ l de Buffer ACW1 en la columna QIAamp Mini. Deje la tapa de la columna abierta y conecte la bomba de vacío. Después de que se haya extraído todo el Buffer ACW1 a través de la columna QIAamp Mini, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar.
11. Dispense 750 μ l de Buffer ACW2 en la columna QIAamp Mini. Deje la tapa de la columna abierta y conecte la bomba de vacío. Después de que se haya extraído todo el Buffer ACW2 a través de la columna QIAamp Mini, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar.
12. Dispense 750 μ l de etanol (96-100 %) en la columna QIAamp Mini. Deje la tapa de la columna abierta y conecte la bomba de vacío. Después de que se haya extraído todo el

etanol a través de la columna de centrifugación, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar.

13. Cierre la tapa de la columna QIAamp Mini. Retírela del colector de vacío y deseche el VacConnector. Coloque la columna QIAamp Mini en un tubo de lavado limpio de 2 ml (del paso 8) y centrifugue a máxima velocidad ($20.000 \times g$; 14.000 rpm) durante 3 ($\pm 0,5$) min.
14. Introduzca la columna QIAamp Mini en un tubo de lavado nuevo de 2 ml. Abra la tapa e incube el conjunto a temperatura ambiente durante 3 min para secar la membrana por completo.
15. Introduzca la columna QIAamp Mini en un tubo de elución limpio de 1,5 ml (proporcionado) y deseche el tubo de lavado de 2 ml del paso 14. Dispense cuidadosamente 20-150 μ l de Buffer AVE en el centro de la membrana de la columna QIAamp Mini. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente durante 3 ($\pm 0,5$) min.

Importante: Asegúrese de que el Buffer AVE de elución esté equilibrado a temperatura ambiente (15-25 °C). Si la elución se realiza en volúmenes pequeños (<50 μ l), el tampón de elución se debe dispensar sobre el centro de la membrana para permitir la elución completa de los ácidos nucleicos unidos.

El volumen de elución es flexible y se puede adaptar según las necesidades de las aplicaciones posteriores.

La elución con volúmenes más pequeños de Buffer AVE conduce a concentraciones más altas de ácido nucleico pero puede dar lugar a un rendimiento total más bajo.

El volumen de elución recuperado puede ser hasta 5 μ l menor que el volumen de elución que se aplica a la membrana de la columna QIAamp Mini.

Nota: Para las muestras en las que se espera bajo ácido nucleico, se recomienda utilizar un tubo de baja unión para la elución (no suministrado).

16. Centrifugue en una microcentrifugadora a máxima velocidad ($20.000 \times g$; 14.000 rpm) durante 1 min para eluir los ácidos nucleicos.

Nota: Coloque las tapas de los tubos de elución de modo que estén orientadas hacia la dirección opuesta a la rotación del rotor (p. ej., si el rotor gira en sentido horario, oriente las tapas en sentido antihorario).

Protocolo clásico: Purificación de ácidos nucleicos circulantes de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano

Este protocolo constituye el protocolo sin cambios del *Manual de uso del QIAamp DSP Circulating NA Kit*, revisión 3 (R3), para su uso; por ejemplo, con flujos de trabajo existentes validados por el usuario para 1-5 ml de plasma humano.

Cuestiones importantes antes de comenzar

- Todos los pasos de centrifugación se realizan a temperatura ambiente (15-25 °C).
- Desconecte el vacío entre pasos para garantizar que se aplique un vacío constante y uniforme durante los pasos del protocolo.
Nota: La presión de la bomba de vacío debe ser de -800 a -900 mbar.
- Deje que las muestras se equilibren a temperatura ambiente.
- Use tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline, PBS) para llevar el volumen de la muestra al volumen más exacto posible (de 1 a 5 ml).
- Configure el QIAvac 24 Plus tal como se describe en la página 21.
- Caliente un baño de agua o un bloque calefactor a 60 °C para usarlos con tubos para centrifugadora de 50 ml en el paso 3.
- Caliente un bloque calefactor a 56 °C para usarlo con tubos de lavado de 2 ml en el paso 14.
- Deje que las columnas de centrifugación QIAamp Mini se equilibren durante al menos 1 hora a temperatura ambiente antes de usarlas.
- Asegúrese de que el Buffer ACB, el Buffer ACW1 y el Buffer ACW2 se hayan preparado (adición de isopropanol o etanol) según las instrucciones de la página 26.
- Añada ARN transportador reconstituido en Buffer AVE al Buffer ACL según las instrucciones de la Tabla 4.

Tabla 4. Volumen de Buffer ACL y ARN transportador (disuelto en Buffer AVE) necesario para procesar muestras de 1-5 ml de plasma sanguíneo humano

Configuración para ml de plasma	A	B	C	D	E	
	1 ml	2 ml	3 ml	4 ml	5 ml	
Número de muestras	Buffer ACL (ml)					ARN transportador en Buffer AVE (µl)
1	0,9	1,8	2,6	3,5	4,4	5,6
2	1,8	3,5	5,3	7,0	8,8	11,3
3	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	16,9
4	3,5	7,0	10,6	14,1	17,6	22,5
5	4,4	8,8	13,2	17,6	22,0	28,1
6	5,3	10,6	15,8	21,1	26,4	33,8
7	6,2	12,3	18,5	24,6	30,8	39,4
8	7,0	14,1	21,1	28,2	35,2	45,0
9	7,9	15,8	23,8	31,7	39,6	50,6
10	8,8	17,6	26,4	35,2	44,0	56,3
11	9,7	19,4	29,0	38,7	48,4	61,9
12	10,6	21,1	31,7	42,2	52,8	67,5
13	11,4	22,9	34,3	45,8	57,2	73,1
14	12,3	24,6	37,0	49,3	61,6	78,8
15	13,2	26,4	39,6	52,8	66,0	84,4
16	14,1	28,2	42,2	56,3	70,4	90,0
17	15,0	29,9	44,9	59,8	74,8	95,6
18	15,8	31,7	47,5	63,4	79,2	101,3
19	16,7	33,4	50,2	66,9	83,6	106,9
20	17,6	35,2	52,8	70,4	88,0	112,5
21	18,5	37,0	55,4	73,9	92,4	118,1
22	19,4	38,7	58,1	77,4	96,8	123,8
23	20,2	40,5	60,7	81,0	101,2	129,4
24	21,1	42,2	63,4	84,5	105,6	135,0

Procedimiento: Protocolo clásico

1. Pipetee QIAGEN Proteinase K, plasma y Buffer ACL en este orden en un tubo para centrifugadora de 50 ml (no suministrado).

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

2. Cierre el tapón y mezcle mediante agitación vorticial de pulsos durante 30 s.
Asegúrese de que se produzca un vórtice visible en el tubo. Para que la lisis sea eficaz, es esencial que la muestra y el Buffer ACL se mezclen bien hasta obtener una solución homogénea.
Nota: No interrumpa el procedimiento en este momento. Continúe de inmediato con el paso 3 para iniciar la incubación de lisis.
3. Incube a 60 °C (± 1 °C) durante 30 (± 2) min.
4. Vuelva a colocar el tubo sobre la mesa del laboratorio y desenrosque el tapón.
5. Añada Buffer ACB al lisado que se encuentra en el tubo. Elija el volumen de acuerdo con la configuración del paso 1.

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

6. Cierre el tapón y mezcle bien mediante agitación vorticial de pulsos durante 30 s.
Asegúrese de que se produzca un vórtice visible en el tubo. Para que la lisis sea eficaz, es esencial que el lisado y el Buffer ACB se mezclen bien hasta obtener una solución homogénea.
7. Incube la mezcla de lisado-Buffer ACB en el tubo durante 5 (± 1) min en hielo.

8. Inserte la columna QIAamp Mini en el VacConnector del QIAvac 24 Plus (consulte «Montaje del QIAvac 24 Plus vacuum manifold», página 21). Inserte un extensor de columna de 20 ml en la columna QIAamp Mini abierta.

Asegúrese de que el extensor de columna esté firmemente insertado en la columna QIAamp Mini para evitar la fuga de la muestra.

Nota: Mantenga el tubo de lavado para la centrifugación en seco en el paso 13.

9. Aplique con cuidado el lisado del paso 7 en el extensor de columna de la columna QIAamp Mini. Conecte la bomba de vacío aplicando una presión de -800 a -900 mbar. Cuando se hayan extraído por completo todos los lisados a través de las columnas, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar. Retire con cuidado el extensor de columna y deséchelo.

Tenga en cuenta que los grandes volúmenes de lisado de muestra (aproximadamente 18 ml al comenzar con una muestra de 5 ml) pueden tardar hasta 20 min en atravesar la membrana QIAamp Mini mediante fuerza de vacío.

Para una liberación rápida y conveniente de la presión de vacío, debe utilizarse el Vacuum Regulator (parte del QIAvac Connecting System).

Nota: Para evitar la contaminación cruzada, tenga cuidado de no cruzar las columnas QIAamp Mini vecinas al quitar los extensores de columna.

10. Dispense 600 μ l de Buffer ACW1 en la columna QIAamp Mini. Deje la tapa de la columna abierta y conecte la bomba de vacío. Después de que se haya extraído todo el Buffer ACW1 a través de la columna QIAamp Mini, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar.
11. Dispense 750 μ l de Buffer ACW2 en la columna QIAamp Mini. Deje la tapa de la columna abierta y conecte la bomba de vacío. Después de que se haya extraído todo el Buffer ACW2 a través de la columna QIAamp Mini, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar.
12. Dispense 750 μ l de etanol (96-100 %) en la columna QIAamp Mini. Deje la tapa de la columna abierta y conecte la bomba de vacío. Después de que se haya extraído todo el etanol a través de la columna de centrifugación, desconecte la bomba de vacío y libere la presión hasta obtener 0 mbar.

13. Cierre la tapa de la columna QIAamp Mini. Retírela del colector de vacío y deseche el VacConnector. Coloque la columna QIAamp Mini en un tubo de lavado limpio de 2 ml (del paso 8) y centrifugue a máxima velocidad (20.000 × g; 14.000 rpm) durante 3 (±0,5) min.
14. Introduzca la columna QIAamp Mini en un tubo de lavado nuevo de 2 ml. Abra la tapa e incube el conjunto a 56 °C (±1 °C) durante 10 (±1) min para secar la membrana por completo.
15. Introduzca la columna QIAamp Mini en un tubo de elución limpio de 1,5 ml (proporcionado) y deseche el tubo de lavado de 2 ml del paso 13. Dispense cuidadosamente 20-150 µl de Buffer AVE en el centro de la membrana de la columna QIAamp Mini. Cierre la tapa e incube a temperatura ambiente durante 3 (±0,5) min.

Importante: Asegúrese de que el Buffer AVE de elución esté equilibrado a temperatura ambiente (15-25 °C). Si la elución se realiza en volúmenes pequeños (<50 µl), el tampón de elución se debe dispensar sobre el centro de la membrana para permitir la elución completa de los ácidos nucleicos unidos.

El volumen de elución es flexible y se puede adaptar según las necesidades de las aplicaciones posteriores.

La elución con volúmenes más pequeños de Buffer AVE conduce a concentraciones más altas de ácido nucleico, pero puede dar lugar a un rendimiento total más bajo.

El volumen de eluido recuperado puede ser hasta 5 µl menor que el volumen de elución que se aplica a la columna QIAamp Mini.

Nota: Para las muestras en las que se espera bajo ácido nucleico, se recomienda utilizar un tubo de baja unión para la elución (no suministrado).

16. Centrifugue en una microcentrifugadora a máxima velocidad (20.000 × g; 14.000 rpm) durante 1 min para eluir los ácidos nucleicos.

Nota: Coloque las tapas de los tubos de elución de modo que estén orientadas hacia la dirección opuesta a la rotación del rotor (p. ej., si el rotor gira en sentido horario, oriente las tapas en sentido antihorario).

Control de calidad

En cumplimiento del sistema de gestión de calidad con certificación ISO de QIAGEN, cada lote del QIAamp DSP Circulating NA Kit se analiza en relación con especificaciones predeterminadas para garantizar la uniformidad de la calidad de los productos.

Limitaciones

Se ha establecido el rendimiento del sistema para el aislamiento de los ácidos nucleicos libres circulantes utilizando las muestras de plasma humano generadas a partir de los siguientes tubos de recogida de sangre:

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

Es responsabilidad del usuario validar el rendimiento del sistema con los procedimientos utilizados en cada laboratorio que no estén contemplados en los estudios de rendimiento de QIAGEN.

Para minimizar el riesgo de que se produzcan efectos negativos sobre los resultados diagnósticos, deben utilizarse controles apropiados para las aplicaciones posteriores. Para realizar validaciones adicionales se recomienda seguir las directrices de la International Conference on Harmonization of Technical Requirements (ICH) detalladas en ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures: Test And Methodology.

Todo resultado diagnóstico que se genere debe interpretarse en combinación con otros datos clínicos o de laboratorio.

Características del rendimiento

Encontrará las características de rendimiento correspondientes en la pestaña resources (recursos) de la página de productos en www.qiagen.com.

Referencias

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

Guía para la resolución de problemas

Esta guía de resolución de problemas puede ayudarle a resolver cualquier problema que pueda surgir. Para obtener más información, también puede consultar la página de preguntas frecuentes (Frequently Asked Questions) de nuestro Centro de servicio técnico: www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx. Los científicos del servicio técnico de QIAGEN se encargarán de responder cualquier pregunta que tenga sobre la información y/o los protocolos de este manual de uso, así como sobre las tecnologías para la preparación de muestras y ensayos de biología molecular (encontrará la información de contacto en www.qiagen.com).

Comentarios y sugerencias

Poco o ningún ácido nucleico en el eluido

- | | |
|--|--|
| a) Uso de plasma no estabilizado | Las muestras de plasma no estabilizado pueden dar lugar a una degradación acelerada del ADN. Le recomendamos seguir CEN/TS 16835-3:2015. Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras. |
| b) Tiempo prolongado entre la extracción de sangre y la preparación del plasma | Los glóbulos sanguíneos nucleados pueden desintegrar y liberar ADN genómico en el plasma, con lo que se diluye el ácido nucleico diana. |
| c) Muestras congeladas y descongeladas más de una vez | Deben evitarse los ciclos repetidos de congelación y descongelación, ya que pueden provocar la degradación del ADN. Use siempre muestras frescas o muestras que se hayan descongelado una sola vez. |
| d) Baja concentración de ADN diana en las muestras | Las muestras de plasma se dejaron reposar a temperatura ambiente durante demasiado tiempo. Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras
Nota: Algunos individuos pueden presentar una baja concentración de ácido nucleico libre circulante en plasma; en este caso, se debe elegir un volumen de muestra mayor y un volumen de elución bajo. |
| e) Lisis insuficiente de la muestra en Buffer ACL | Si se sometió a QIAGEN Proteinase K a temperatura elevada durante un período de tiempo prolongado, es posible que pierda actividad. Repita el procedimiento con muestras nuevas y QIAGEN Proteinase K fresca. |
| f) La mezcla de Buffer ACL-ARN transportador no se mezcló lo suficiente | Mezcle el Buffer ACL con el ARN transportador invirtiendo con suavidad el tubo de Buffer ACL-ARN transportador al menos 10 veces. |

Comentarios y sugerencias

- | | | |
|----|--|--|
| g) | Se usó un bajo porcentaje de etanol en lugar de 96-100 % | Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras y etanol al 96-100 %. No utilice alcohol desnaturalizado, que contenga otras sustancias como metanol o metiletilcetona. |
| h) | Buffer ACB preparado incorrectamente | Compruebe que el Buffer ACB concentrado se haya reconstituido con el volumen correcto de isopropanol (no etanol, consulte la página 26). |
| i) | Buffer ACW1 o Buffer ACW2 preparado incorrectamente | Compruebe que los concentrados de Buffer ACW1 y Buffer ACW2 se hayan diluido con el volumen correcto de etanol (consulte la página 26). Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras. |
| j) | Buffer ACW1 o Buffer ACW2 preparados con etanol al 70 % | Compruebe que los concentrados de Buffer ACW1 y Buffer ACW2 se hayan diluido con etanol al 96-100 % (consulte la página 26). Repita el procedimiento de purificación con nuevas muestras. |

El ADN o ARN no tiene un buen rendimiento en reacciones enzimáticas anterógradas

- | | | |
|----|---|---|
| a) | Poco o ningún ADN en el eluido | Consulte la sección «Poco o ningún ácido nucleico en el eluido» anterior para conocer los posibles motivos. Aumente la cantidad de eluido que se añade a la reacción, si es posible. |
| b) | Se usó un volumen de elución inadecuado | Determine el volumen máximo de eluido adecuado para su aplicación posterior. Reduzca o aumente el volumen de eluido añadido a la aplicación posterior en consonancia. El volumen de elución se puede adaptar proporcionalmente.

Nota: La elución con volúmenes más pequeños de Buffer AVE conduce a concentraciones más altas de ácido nucleico pero puede dar lugar a un rendimiento total más bajo. |
| c) | Los tampones no se mezclaron bien | Los componentes de sal y etanol del Buffer ACW2 de lavado pueden haberse desprendido después de haber quedado en reposo durante un período de tiempo prolongado entre series. Siempre mezcle meticulosamente los tampones antes de cada serie. |
| d) | Interferencia debido al ARN transportador | Si la presencia de ARN transportador en el eluido interfiere con la reacción enzimática anterógrada, puede que sea necesario reducir la cantidad de ARN transportador u omitirlo por completo. |

Manipulación general

- | | | |
|----|-------------------------------|--|
| a) | Columna QIAamp Mini obstruida | Si se reduce la velocidad de flujo, se puede prolongar el tiempo de vacío. De forma alternativa, cierre el VacValve, si se utiliza, y retire con cuidado el conjunto del extensor de columna-VacConnector-VacValve de la columna QIAamp Mini sin perder el lisado del extensor de columna.










Retire la columna QIAamp Mini del colector de vacío, colóquela en un tubo de lavado de 2 ml y centrifúguela a máxima velocidad hasta que la muestra haya atravesado por completo la membrana. Vuelva a colocar el conjunto extensor de columna-VacConnector-VacValve que contiene el lisado restante. Conecte la bomba de vacío, abra la VacValve y continúe con la carga del lisado restante. |
|----|-------------------------------|--|

Comentarios y sugerencias

- Repita el procedimiento anterior si la columna QIAamp Mini continúa obstruida.
- Es posible que se hayan formado crioprecipitados en plasma debido a la repetición de los ciclos de congelación y descongelación. Estos pueden bloquear la columna QIAamp Mini. No use plasma que se haya congelado y descongelado más de una vez.
- En caso de que aparezcan crioprecipitados, elimine la muestra mediante centrifugación durante 5 min a $16.000 \times g$.
- b) Volúmenes de elución variables
- Diferentes muestras pueden afectar al volumen de eluido final. El volumen de eluido recuperado puede ser hasta 5 μ l menor que el volumen de elución que se aplica a la columna QIAamp Mini.
- c) No se alcanzó una presión de vacío de -800 a -900 mbar
- El conector de vacío no está herméticamente cerrado. Presione la tapa del colector de vacío después de activarlo. Compruebe si se alcanzó la presión de vacío.
- La junta de la tapa de QIAvac está gastada. Examine el sello del colector y sustitúyalo si es necesario.
- Las VacValves están gastadas. Extraiga todas las VacValves e inserte VacConnectors directamente en las extensiones luer. Inserte las columnas QIAamp Mini en los VacConnectors, cierre la tapa de las columnas y conecte el vacío. Compruebe si se alcanzó la presión de vacío. Sustituya las VacValves si es necesario.
- La conexión con la bomba de vacío presenta fugas. Cierre toda la extensión luer con tapones luer y conecte la bomba de vacío. Compruebe que la presión de vacío sea estable después de conectar la bomba (y que la válvula del Vacuum Regulator esté cerrada). Intercambie las conexiones entre la bomba y el colector de vacío si es necesario.
- Si aún no se alcanza la presión de vacío, sustituya la bomba de vacío por una de mayor potencia.


Símbolos

En las instrucciones de uso o en el embalaje y en el etiquetado aparecen los siguientes símbolos:

Símbolo	Definición del símbolo
	Contiene suficientes reactivos para <N> reacciones
	Fecha de caducidad
	Este producto cumple los requisitos del reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro.
	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número de material (es decir, etiquetado de los componentes)
	Componentes
	Contiene
	Número

Símbolo

Definición del símbolo

	Número mundial de artículo comercial
Rn	“R” es la revisión de las Instrucciones de uso y “n” es el número de revisión
	Limitación de temperatura
	Fabricante
	Consultar las instrucciones de uso
	Mantener alejado de la luz solar
	Advertencia/precaución
	A su recepción
	Abrir a la entrega; guardar las columnas de centrifugación QIAamp Mini a 2-8 °C
	Volumen
	Adición

Símbolo

Definición del símbolo



Anotar la fecha actual tras añadir etanol al frasco

EtOH

Etanol



Anotar la fecha actual tras añadir isopropanol al frasco

IPA

Isopropanol

→

Conduce a

GITC

Tiocianato de guanidina

GuHCl

Clorhidrato de guanidina

BRIJ 58

BRIJ 58

PROTK

Proteínasa K

UDI

Identificador único de dispositivo

Apéndice A: Recomendación para la separación y el almacenamiento de plasma de sangre

Para los tubos de recogida de sangre de estabilización (p. ej., PAXgene ccfDNA Tube o Streck Cell-Free DNA Tube), siga las instrucciones del fabricante para la separación y el almacenamiento de plasma. Le recomendamos validar estas condiciones de almacenamiento junto con la aplicación posterior específica y la diana.

Para los BCT no estabilizados, recomendamos seguir la norma ISO 20186-3:2019 Análisis de diagnóstico molecular in vitro. Especificaciones para los procesos preanalíticos para sangre total venosa. Parte 3: ADN libre circulante aislado del plasma o CEN/TS 17742 Análisis de diagnóstico molecular in vitro. Especificaciones para los procesos de preanálisis de sangre total venosa. ARN libre de células circulantes aislado del plasma.

Para aislar los ácidos nucleicos libres circulantes de las muestras de sangre, recomendamos seguir este protocolo que incluye un paso de centrifugación de fuerza G de alta intensidad para quitar los residuos celulares y así reducir la cantidad de ADN y ARN celular o genómico en la muestra.

1. Coloque la sangre total conservada en EDTA en tubos BD Vacutainer® (u otros tubos de sangre primarios que contienen EDTA como anticoagulante) en una centrifugadora enfriada a 4 °C con rotor oscilante y huecos adecuados.
2. Centrifugue las muestras de sangre durante 10 min a 1900 × g (3000 rpm) a 4 °C.
3. Aspire con cuidado el sobrenadante de plasma sin romper la capa de interfaz entre célula y plasma. Se puede obtener aproximadamente 4-5 ml de plasma de un tubo de sangre primario de 10 ml.

Nota: En esta etapa, se puede usar el plasma para la extracción del ácido nucleico circulante. Sin embargo, la siguiente centrifugación de alta velocidad eliminará los residuos celulares adicionales y la contaminación de los ácidos nucleicos circulantes por parte del ADN o ARN genómico derivado de los glóbulos sanguíneos nucleados dañados.

4. El plasma aspirado se transfiere a un tubo para centrifugadora nuevo.
5. Centrifugue las muestras de plasma durante 10 min a 16.000 x g (en un rotor de ángulo fijo) a 4 °C.

De esta manera se eliminarán los ácidos nucleicos celulares adicionales adheridos a los residuos celulares.

6. Retire con cuidado el sobrenadante y transfíralo a un tubo nuevo sin romper el sedimento.
7. Si el plasma se va a utilizar para la extracción de ácido nucleico en el mismo día, almacénelo a una temperatura de 2-8 °C hasta continuar con el procesamiento. Para una conservación más prolongada, se pueden conservar alícuotas de plasma de tubos de recogida de sangre estabilizados y no estabilizados a -20 °C (ADN como diana) o a -80 °C (ARN como diana) durante al menos 4 semanas. Antes de usar el plasma para la extracción de ácido nucleico circulante, descongele los tubos de plasma a temperatura ambiente.
8. **Opcional:** Para eliminar los crioprecipitados, centrifugue las muestras de plasma durante 5 min a 16.000 x g (en un rotor de ángulo fijo).

Opcional: Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo y comience con el protocolo de extracción de ácido nucleico circulante.

Apéndice B: Consideraciones generales sobre la manipulación del ARN

Manipulación del ARN

Las ribonucleasas (ARNasas) son enzimas muy estables y activas que, en general, no requieren cofactores para actuar. Dado que las ARNasas son difíciles de inactivar y que se necesitan solamente cantidades minúsculas para destruir el ARN, no utilice ningún material de plástico o de vidrio sin eliminar antes una posible contaminación con ARNasa. Deben tomarse precauciones extremas para evitar introducir accidentalmente ARNasas en la muestra de ARN durante el procedimiento de purificación o después de este. Para crear y mantener un entorno libre de ARNasa, durante el tratamiento previo y el uso de los recipientes desechables y no desechables y de las soluciones deben adoptarse las siguientes medidas de precaución mientras se trabaja con ARN.

Manipulación general

Siempre que se trabaje con ARN debe utilizarse una técnica aséptica microbiológica adecuada. Las manos y el polvo pueden ser portadores de bacterias y hongos y constituyen las fuentes más comunes de contaminación con ARNasa. Al manipular los reactivos y las muestras de ARN, use siempre guantes de látex o de vinilo para prevenir la contaminación con ARNasa procedente de la superficie de la piel o de un equipo de laboratorio con polvo. Cámbiese los guantes con frecuencia y mantenga los tubos cerrados siempre que sea posible. Mantenga el ARN purificado en hielo cuando pipete las alícuotas para aplicaciones posteriores.

Material de plástico desechable

Se recomienda usar tubos de polipropileno estériles, libres de ARNasa y desechables durante todo el procedimiento.

Información para pedidos

Producto	Contenido	N.º de cat.
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Para 50 preparaciones: Columnas QIAamp Mini, extensores de columna, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reactivos, tampones y tubos de recogida	61504
Accesorios		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Colector de vacío para el procesamiento de 1-24 columnas de centrifugación: QIAvac 24 Plus vacuum manifold, tapones luer y acoplamientos rápidos	19413
Vacuum Pump*	Bomba de vacío universal	84010 [EE. UU. y Canadá] 84000 [Japón] 84020 [resto del mundo]
QIAvac Connecting System*	Sistema para conectar el colector de vacío con la bomba de vacío: incluye bandeja, frascos de residuos, tubos, acoplamientos, válvula, calibre y 24 VacValves	19419

* Para el uso con protocolos de vacío.

Para obtener información actualizada sobre licencias y exenciones de responsabilidad específicas del producto, consulte el manual de uso o la guía del usuario del kit de QIAGEN correspondiente. Los manuales de uso y las guías del usuario de los kits de QIAGEN están disponibles en www.qiagen.com o pueden solicitarse a los servicios técnicos de QIAGEN o a su distribuidor local.

Historial de revisiones del documento

Revisión	Descripción
R1, junio de 2022	IVDR Kit, publicación de la versión 2, no se realizaron modificaciones en los protocolos ni en los datos de rendimiento en comparación con la versión 1 del kit; se añadió el aislamiento «manual» al uso previsto; se realizaron actualizaciones y correcciones menores

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

Esta página se ha dejado intencionadamente en blanco

Acuerdo de licencia limitada para el QIAamp DSP Circulating NA Kit

La utilización de este producto implica por parte de cualquier comprador o usuario del producto la aceptación de los siguientes términos:

1. El producto puede utilizarse únicamente conforme a los protocolos suministrados con el producto y a este manual de uso y para su uso exclusivo con los componentes incluidos en el panel. QIAGEN no ofrece licencia alguna bajo ninguna de sus propiedades intelectuales para utilizar o incorporar los componentes suministrados en este panel con componentes no incluidos en el mismo, excepto según se describe en los protocolos proporcionados con el producto, este manual de uso y otros protocolos disponibles en www.qiagen.com. Algunos de estos protocolos adicionales han sido proporcionados por usuarios de QIAGEN para usuarios de QIAGEN. QIAGEN no ha probado ni optimizado estos protocolos en profundidad. Por ello, QIAGEN no los garantiza ni asegura que no infrinjan los derechos de terceros.
2. Aparte de las licencias expresamente especificadas, QIAGEN no garantiza que este panel ni su(s) uso(s) no infrinjan derechos de terceros.
3. Este panel y sus componentes tienen licencia para un solo uso y no se pueden reutilizar, reacondicionar ni revender.
4. QIAGEN renuncia específicamente a cualquier otra licencia, explícita o implícita, distinta de las licencias expresamente especificadas.
5. El comprador y el usuario del panel aceptan no realizar ni permitir a otros realizar ningún paso que pueda conducir a acciones prohibidas en las especificaciones anteriores o que pueda facilitarlas. QIAGEN se reserva el derecho de emprender acciones legales ante cualquier tribunal para el cumplimiento de las prohibiciones especificadas en este Acuerdo de licencia limitada y recuperará todos los gastos derivados de la investigación y de los gastos judiciales, incluidas las costas procesales, en cualquier acción emprendida para hacer cumplir este Acuerdo de licencia limitada o cualquier otro derecho de propiedad intelectual en relación con este kit y/o con sus componentes.

Para consultar los términos actualizados de la licencia, visite www.qiagen.com.

Marcas comerciales: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, (QIAGEN Group); Agilent® (Agilent Technologies, Inc.); BD™, Vacutainer® (Becton Dickinson and Company); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH); Tween™ (ICI Americas Inc.). No debe considerarse que los nombres registrados, marcas comerciales, etc., que se utilizan en este documento no están protegidos por la ley aunque no se hayan identificado específicamente como tales.

Jun-2022 HB-3049-001 1127632 © 2022 QIAGEN. Reservados todos los derechos.

