

# Folha de protocolo QIASymphony SP

## Tissue\_LC\_200\_V7\_DSP e Tissue\_HC\_200\_V7\_DSP

### Informações gerais

Para utilização em diagnóstico in vitro

Este protocolo destina-se à purificação do ADN total de tecidos e de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFPE) utilizando o QIASymphony® SP e o QIASymphony DSP DNA Mini Kit. Os protocolos para células obtidas a partir de culturas e culturas de bactérias estão em fase de desenvolvimento e estarão disponíveis em breve.

Dependendo do tipo de amostra, recomenda-se que se utilize o protocolo de baixo teor (LC) ou de elevado teor (HC). Os tecidos resultarão em rendimentos de ADN maiores se forem processados com o protocolo de elevado teor; o protocolo de baixo teor, quando combinado com um volume de eluição baixo (50 µl), pode ser usado quando se pretender obter uma alta concentração de ADN. Para tecidos FFPE, recomenda-se a utilização do protocolo de baixo teor.

### Protocolo de baixo teor

<b>Kit</b>	QIASymphony DSP DNA Mini Kit ( n° de cat. 937236)
<b>Material para amostra</b>	Tecido FFPE e tecido*  Numa preparação, podem ser combinadas até 4 secções de tecidos FFPE, cada uma com uma espessura de até 10 µm, ou 8 secções com uma espessura de até 5 µm e com uma superfície total até 250 mm <sup>2</sup> .
<b>Nome do protocolo</b>	Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Conjunto de controlo do ensaio predefinido</b>	ACS_Tissue_LC_200_V7_DSP
<b>Volume de eluição</b>	50 µl, 100 µl, 200 µl ou 400 µl
<b>Versão de software necessária</b>	Versão 4.0

\* Ver o protocolo de elevado teor para mais informação sobre amostras de tecido.

Abril 2012



Sample & Assay Technologies

## Protocolo de elevado teor

<b>Kit</b>	QIAsymphony DSP DNA Mini Kit ( n° de cat. 937236)
<b>Material para amostra</b>	Tecido  Quando não está disponível informação sobre o rendimento esperado, recomenda-se que se inicie com 25 mg de material para amostra. Dependendo do rendimento obtido, a dimensão da amostra pode ser aumentada nas preparações seguintes.
<b>Nome do protocolo</b>	Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Conjunto de controlo do ensaio predefinido</b>	ACS_Tissue_HC_200_V7_DSP
<b>Volume de eluição</b>	100 µl, 200 µl ou 400 µl
<b>Versão de software necessária</b>	Versão 4.0

## Material necessário, mas não fornecido

### Para todos os tipos de amostras

- Tampão ATL, 4 x 50 ml (Buffer ATL, 4 x 50 ml, n° cat. 939016)
- Quando é exigido ADN sem ARN: DNase sem RNase A (solução-mãe de 100 mg/ml)

### Para tecido FFPE (desparafinização sem xileno)

- Solução de desparafinização (Deparaffinization Solution, n° cat. 939018)

### Para tecido FFPE (desparafinização com xileno)

- Xileno (99–100%)
- Etanol (96–100%)\*

\* Não utilize álcool desnaturado que contenha substâncias adicionais tal como metanol ou metiletilcetona.

## Bandeja "Sample" (amostra)

<b>Tipo de amostra</b>	Tecido FFPE e tecido
<b>Volume de entrada da amostra</b>	220 $\mu$ l (necessário por amostra, por protocolo)*
<b>Volume de amostra processado</b>	200 $\mu$ l
<b>Tubos de amostra primários</b>	n/a
<b>Tubos de amostra secundários</b>	Consulte <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> para obter mais informação.
<b>Encaixes</b>	Variam em função do tipo de tubo de amostra utilizado; para mais informação, consulte <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> .

\* Visto que a transferência de amostra dos protocolos de elevado e baixo teor é efectuada sem detecção do nível de líquido, o sistema não reconhece quando o volume da amostra é inferior a 220  $\mu$ l. Por essa razão, é necessário assegurar-se de que o volume de entrada da amostra é 220  $\mu$ l.

n/a = não aplicável.

## Bandeja "Reagents and Consumables" (reagentes e consumíveis)

<b>Posição A1 e/ou A2</b>	Cartucho de reagentes
<b>Posição B1</b>	n/a
<b>Suporte de pontas 1–17</b>	Pontas com filtro descartáveis, 200 $\mu$ l ou 1500 $\mu$ l
<b>Suporte de caixa de unidades 1–4</b>	Caixas de unidades com cartuchos de preparação de amostras ou mangas de 8 barras

n/a = não aplicável.

## Bandeja “Waste” (resíduos)

<b>Suporte de caixa de unidades 1–4</b>	Esvazie as caixas de unidades
<b>Suporte de saco de resíduos</b>	Saco de resíduos
<b>Suporte do frasco de resíduos líquidos</b>	Esvazie o frasco de resíduos líquidos

## Bandeja “Eluate” (eluato)

<b>Suporte de eluição (recomenda-se o uso da ranhura 1, posição de arrefecimento)</b>	Consulte <a href="http://www.qiagen.com/goto/dsphandbooks">www.qiagen.com/goto/dsphandbooks</a> para obter mais informação.
---	---

## Material de plástico necessário

	Um lote, 24 amostras*	Dois lotes, 48 amostras*	Três lotes, 72 amostras*	Quatro lotes, 96 amostras*
<b>Pontas com filtro descartáveis, 200 µl<sup>†‡</sup></b>	26	50	74	98
<b>Pontas com filtro descartáveis, 1500 µl<sup>†‡</sup></b>	72	136	200	264
<b>Cartuchos de preparação de amostras<sup>§</sup></b>	21	42	63	84
<b>Mangas de 8 barras<sup>¶</sup></b>	3	6	9	12

\* O uso de menos de 24 amostras por lote ajuda a reduzir o número de pontas com filtro descartáveis necessárias por execução.

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

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

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

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

**Nota:** O número de pontas com filtro fornecido pode diferir dos números visualizados no ecrã táctil, dependendo das definições. Recomenda-se carregar o número máximo de pontas.

## Volume de eluição

O volume de eluição é seleccionado no ecrã táctil. Dependendo do tipo de amostra e do teor de ADN, o volume de eluato final pode ser até 15  $\mu$ l inferior ao volume seleccionado. Devido ao facto de o volume de eluato poder variar, recomenda-se verificar o actual volume de eluato quando se utiliza um sistema de configuração automática de amostras que não verifica o volume de eluato antes da transferência. Uma eluição em volumes mais baixos aumenta a concentração de ADN final, mas reduz ligeiramente o rendimento. Recomenda-se utilizar um volume de eluição adequado à aplicação a jusante prevista.

## Preparação do material de amostra

Quando trabalha com substâncias químicas, use sempre um avental de laboratório adequado, luvas descartáveis e óculos de protecção. Para mais informações, consulte as fichas de dados de segurança do material (MSDS) adequadas, disponíveis junto do fornecedor do produto.

### Aspecto importante antes do início do procedimento

- As partículas magnéticas de QIASymphony copurificam o ARN e ADN quando estes estão juntamente presentes na amostra. Sendo exigido ADN sem ARN, adicione RNase A à amostra no passo indicado no respectivo protocolo de pré-tratamento.

### Outros aspectos importantes antes de iniciar o procedimento

- Verifique se o tampão ATL contém precipitado branco. Se necessário, incube durante 30 minutos a 37°C com agitação ocasional para dissolver o precipitado.
- Aqueça um Thermomixer ou agitador-incubador até à temperatura necessária ao respectivo pré-tratamento.

## Tecidos

Para a purificação do ADN pode ser utilizado tecido fresco ou congelado. O rendimento e a qualidade do ADN depende do tipo de tecido, da fonte e condições de armazenamento. O tecido fresco pode ser cortado em pedaços pequenos e conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$  antes de ser processado. Em geral, recomenda-se que se utilize o protocolo de elevado teor, o qual resultará em rendimentos de ADN mais elevados. Só se recomenda utilizar o protocolo de baixo teor em combinação com o volume de eluição de 50  $\mu$ l volume quando é necessário obter elevadas concentrações de ADN para a análise a jusante. Quando não está disponível informação sobre o rendimento esperado, recomenda-se que se inicie com 25 mg de material para amostra utilizando o protocolo de elevado teor e o volume de eluição de 200  $\mu$ l. Dependendo do rendimento obtido, a dimensão da amostra pode ser aumentada ou o volume de eluição pode ser reduzido nas preparações seguintes. Tome nota que sobrecargas de preparações em combinação com baixos

volumes de eluição pode causar um arrastamento de partículas magnéticas para o eluato e, deste modo, afectar a pureza de ADN e a análise a jusante.

## Protocolo de pré-tratamento para o tecido

1. **Transfira a amostra de tecido para um tubo de microcentrifugação de 2 ml (não incluído).**
2. **Adicione 220 µl de tampão ATL.**
3. **Adicione 20 µl de proteinase K e misture batendo ligeiramente no tubo.**

**Nota:** Utilize proteinase K do suporte de enzimas do QIAasymphony DSP DNA Mini Kit.

4. **Coloque o tubo no Thermomixer ou agitador-incubador e incube a 56°C com agitação de 900 rpm (ou até o tecido ficar completamente lisado).**

**Nota:** O tempo de lise varia em função do tipo de tecido processado. Na maior parte dos tecidos, a lise está completada dentro de 3 horas. Se a lise estiver incompleta ao fim de 3 horas conforme indicado na presença de material insolúvel ou lisatos altamente viscosos, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser removido por meio de centrifugação conforme descrito no passo 6. É possível efectuar a lise durante a noite. Isto não afectará a preparação.

5. **Sendo exigido ADN genómico sem RNA, adicione 4 µl de RNase A (100 mg/ml) e incube durante 2 minutos a uma temperatura ambiente (15–25°C) antes de continuar com o passo 6.**

6. **Homogenize a amostra pipetando para dentro e para fora várias vezes.**

**Nota:** Se a amostra continuar a conter material insolúvel, centrifuge a 3000 x g por 1 minuto.

7. **Transfira cuidadosamente 220 µl do sobrenadante para o tubo da amostra compatível com o porta-amostras do QIAasymphony SP.**

Para a lista completa de tubos de amostras compatíveis, consulte [www.qiagen.com/goto/dsphanbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphanbooks). Recomenda-se o uso de tubos de 2 ml (por ex., Sarstedt, n° de cat. 72.693 ou 72.608).

## Tecido FFPE

Os métodos padrão para tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina resultam sempre numa fragmentação significativa dos ácidos nucleicos. Para reduzir o grau da fragmentação de ADN, é necessário assegurar que:

- as amostras de tecido são fixadas em 4–10% de formalina o mais rápido possível após a remoção cirúrgica.
- um tempo de fixação de 14–24 horas é cumprido (uma fixação mais prolongada pode causar forte fragmentação do ADN, resultando num fraco desempenho dos ensaios a jusante)
- Desidrate as amostras meticulosamente antes de as embeber (a formalina residual pode inibir a digestão da proteinase K)

Para o início da purificação de ADN devem ser utilizadas secções de tecido FFPE recentemente cortadas. Numa preparação, podem ser processadas até 4 secções de tecidos FFPE, cada uma com uma espessura até 10  $\mu\text{m}$ , ou 8 secções com uma espessura de até 5  $\mu\text{m}$  e com uma superfície total até 250  $\text{mm}^2$ . Quando não está disponível informação sobre o rendimento esperado, recomenda-se que se inicie com 3 secções numa única preparação. Dependendo do rendimento e da pureza do DNA, é possível utilizar até 8 secções em preparações subsequentes.

## Protocolo de pré-tratamento para tecido FFPE

### Desparafinização com solução de desparafinização

1. **Com um bisturi, corte a parafina excessiva do bloco da amostra.**
2. **Corte até 4 secções com uma espessura de 10  $\mu\text{m}$  ou até 8 secções de 5  $\mu\text{m}$ .**  
**Nota:** Se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, elimine as primeiras 2–3 secções.
3. **Coloque as secções imediatamente num tubo Sarstedt de 2 ml (não incluído, nº cat. 72.693 ou 72.608) compatível com o porta-amostras do QIASymphony SP.**
4. **Adicione 200  $\mu\text{l}$  de tampão ATL às secções.**
5. **Adicione 20  $\mu\text{l}$  de proteinase K.**  
**Nota:** Utilize proteinase K do suporte de enzimas do QIASymphony DSP DNA Mini Kit.
6. **Adicione 160  $\mu\text{l}$  ou 320  $\mu\text{l}$  de solução de desparafinização (ver a tabela abaixo) e misture tudo no vórtex.**

Espessura das secções	Número de secções	Volume da solução de desparafinização
5 $\mu\text{m}$	1–4	160 $\mu\text{l}$
	5–8	320 $\mu\text{l}$
10 $\mu\text{m}$	1–2	160 $\mu\text{l}$
	3–4	320 $\mu\text{l}$

7. **Coloque o tubo no Thermomixer ou agitador-incubador e incube a 56°C durante 1 hora com agitação de 1000 rpm até o tecido ficar completamente lisado.**

**Nota:** O tempo de lise varia em função do tipo de tecido processado. Na maior parte dos tecidos, a lise está completada dentro de 1 hora. Se a lise ficar incompleta ao fim de 1 hora conforme indicado na presença de material insolúvel, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser removido por meio de centrifugação conforme descrito no passo 10. É possível efectuar a lise durante a noite, uma vez que isso não afectará a preparação.

**8. Incube a 90°C durante 1 hora.**

**Nota:** A incubação a 90°C em tampão ATL converte parcialmente a modificação do formaldeído nos ácidos nucleicos. Um período mais prolongado de incubação ou temperaturas de incubação mais altas podem resultar num ADN mais fragmentado. Sendo utilizado um só bloco de aquecimento, deixe a mostra à temperatura ambiente após a incubação a 56°C até o bloco de aquecimento ter alcançado 90°C.

**9. Sendo exigido ADN genómico sem RNA, adicione 2 µl de RNase A (100 mg/ml) à fase mais baixa e incube durante 2 minutos a temperatura ambiente antes de continuar com o passo 10. Deixe a amostra arrefecer até à temperatura ambiente antes de adicionar RNase A.**

**10. Centrifugue a máxima velocidade e à temperatura ambiente durante 1 minuto.**

**11. Transfira cuidadosamente os tubos (com as duas fases) para o porta-amostras do QIASymphony SP.**

## **Desparafinização com xileno**

**1. Com um bisturi, corte a parafina excessiva do bloco da amostra.**

**2. Corte até 4 secções com uma espessura de 10 µm ou até 8 secções de 5 µm.**

**Nota:** Se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, elimine as primeiras 2–3 secções.

**3. Coloque as secções imediatamente num tubo de microcentrifugação de 1,5 or 2 ml (não incluído) e adicione 1 ml de xileno à amostra. Feche a tampa e agite fortemente no vórtex por 10 segundos.**

**4. Centrifugue a máxima velocidade e à temperatura ambiente durante 2 minutos.**

**5. Retire o sobrenadante por meio de pipetagem. Não remova qualquer pellet.**

**6. Adicione 1 ml de etanol (96–100%) ao pellet e misture com o vórtex.**

**Nota:** O etanol extrai o xileno residual da amostra.

**7. Centrifugue a máxima velocidade e à temperatura ambiente durante 2 minutos.**

**8. Retire o sobrenadante por meio de pipetagem. Não remova qualquer pellet.**

**Nota:** Remova meticulosamente quaisquer resíduos de etanol utilizando uma ponta de pipeta fina.

**9. Abra o tubo e incube à temperatura ambiente (15–25°C) por 10 minutos ou até todo o etanol residual tiver sido evaporado.**

**Nota:** A incubação pode ser efectuada a temperaturas até 37°C.

**10. Ressuspenda o pellet em 220 µl de tampão ATL.**

**11. Adicione 20 µl de proteinase K e misture com o vórtex.**

**Nota:** Utilize proteinase K do suporte de enzimas do QIASymphony DSP DNA Mini Kit.

**12. Incube a 56°C por 1 hora (ou até a amostra ficar completamente lisada).**

**Nota:** O tempo de lise varia em função do tipo de tecido processado. Na maior parte dos tecidos, a lise está completada dentro de 1 horas. Se a lise estiver incompleta ao fim de 1



hora conforme indicado na presença de material insolúvel, o tempo de lise pode ser prolongado ou o material insolúvel pode ser removido por meio de centrifugação conforme descrito no passo 16. É possível efectuar a lise durante a noite, uma vez que isso não afectará a preparação.

**13. Incube a 90°C durante 1 hora.**

**Nota:** A incubação a 90°C em tampão ATL converte parcialmente a modificação do formaldeído nos ácidos nucleicos. Um período mais prolongado de incubação ou temperaturas de incubação mais altas podem resultar num ADN mais fragmentado. Sendo utilizado um só bloco de aquecimento, deixe a mostra à temperatura ambiente após a incubação a 56°C até o bloco de aquecimento ter alcançado 90°C.

**14. Centrifugue brevemente a amostra para remover as gotas no interior da tampa.**

**15. Sendo exigido ADN genómico sem RNA, adicione 2 µl de RNase A (100 mg/ml) e incube durante 2 minutos à temperatura ambiente antes de continuar com o passo 16. Deixe a amostra arrefecer até à temperatura ambiente antes de adicionar RNase A.**

**16. Transfira cuidadosamente 220 µl do lisato para o tubo da amostra compatível com o porta-amostras do QIA Symphony SP.**

**Nota:** Se o lisato contém material não digerido, centrifugue a velocidade máxima e à temperatura ambiente por 2 minutos antes de transferir o sobrenadante para os tubos da amostra. Para a lista completa de tubos de amostras compatíveis, consulte [www.qiagen.com/goto/dsphanhandbooks](http://www.qiagen.com/goto/dsphanhandbooks). Recomenda-se o uso de tubos de 2 ml (por ex., Sarstedt, n.º de cat. 72.693 ou 72.608).

**Nota:** Os protocolos de tecido FFPE foram especialmente concebidos para copurificar apenas pequenas quantidades de ARN. Isto conduz a um valor de medição fotométrica mais reduzido do que os valores obtidos com o kit de tecido manual QIAamp DSP DNA FFPE.

## **Células obtidas a partir de culturas e bactérias**

Protocolos de pré-tratamento para células obtidas a partir de culturas, bactérias Gram-negativas e Gram-positiva estarão disponíveis em breve.

Para informações actualizadas sobre licenças e limitações de responsabilidade específicas do produto, consulte o respectivo manual do kit QIAGEN ou do utilizador. Os manuais QIAGEN podem ser encomendados junto da Assistência Técnica ou do distribuidor local da QIAGEN. Manuais seleccionados podem ser descarregados no website [www.qiagen.com/literature](http://www.qiagen.com/literature). As fichas de dados de segurança (MSDS) para qualquer produto da QIAGEN podem ser descarregadas em [www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx](http://www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx).

Marcas registadas: QIAGEN®, QIASymphony® (grupo QIAGEN). Os nomes registados, marcas comerciais, etc., utilizados neste documento, mesmo quando não identificados de forma específica como tal, não podem ser considerados como não protegidos por lei.  
© 2012 QIAGEN. Todos os direitos reservados

**www.qiagen.com**

**Australia** ■ 1-800-243-800

**Austria** ■ 0800/281010

**Belgium** ■ 0800-79612

**Canada** ■ 800-572-9613

**China** ■ 021-51345678

**Denmark** ■ 80-885945

**Finland** ■ 0800-914416

**France** ■ 01-60-920-930

**Germany** ■ 02103-29-12000

**Hong Kong** ■ 800 933 965

**Ireland** ■ 1800 555 049

**Italy** ■ 800 787980

**Japan** ■ 03-5547-0811

**Korea (South)** ■ 1544 7145

**Luxembourg** ■ 8002 2076

**The Netherlands** ■ 0800 0229592

**Norway** ■ 800-18859

**Singapore** ■ 65-67775366

**Spain** ■ 91-630-7050

**Sweden** ■ 020-790282

**Switzerland** ■ 055-254-22-11

**UK** ■ 01293-422-911

**USA** ■ 800-426-8157



---

**Sample & Assay Technologies**