

Janeiro de 2021

Instruções de uso (Manual) do QIAamp[®] DSP DNA Mini Kit



Versão 2



Para uso em diagnóstico in vitro

REF

61304



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, ALEMANHA

R4 **MAT**

1122787BR



Conteúdo

Uso pretendido.....	5
Descrição e princípio	6
Lise com proteinase K	6
Purificação nas colunas de centrifugação do QIAamp Mini.....	8
Adsorção para a membrana QIAamp	8
Remoção de contaminantes residuais.....	8
Eluição de ácidos nucleicos puros	9
Purificação de DNA automatizada no QIAcube/QIAcube Connect MDx	9
Resumo e explicação	11
Materiais fornecidos	12
Conteúdo do kit	12
Materiais necessários, mas não fornecidos	13
Avisos e precauções	15
Informações de segurança.....	15
Precauções	16
Armazenamento e manuseio de reagentes	17
Armazenamento e manuseio de espécimes.....	17
Procedimento	18
Pontos importantes antes de começar	18
Preparo de reagentes e tampões.....	19
Quantidades do material inicial	20
Preparação de camada leucoplaquetária.....	20

Manuseio das colunas QIAamp Mini	21
Centrifugação	21
Processamento das colunas do QIAamp Mini no QIAvac 24 Plus (protocolos de vácuo).....	23
Configuração do coletor de vácuo QIAvac 24 Plus	25
Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx.....	28
Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais (protocolo de vácuo)	32
Protocolo: Purificação de DNA de tecidos usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx	35
Protocolo: Purificação de DNA de swabs bucais (protocolo de centrifugação).....	40
Protocolo: Purificação de DNA de swabs bucais (protocolo de vácuo)	43
Protocolo: Purificação de DNA total de células em cultura.....	46
Protocolo: Isolamento de DNA bacteriano de fluidos biológicos	48
Protocolo: Isolamento de DNA bacteriano do olho, nasal, faríngeo ou outros swabs	50
Protocolo: Isolamento de DNA genômico de bactérias Gram-positivas.....	52
Controle de qualidade	54
Limitações	54
Símbolos	55
Informações de contato	57
Informações sobre pedidos	58
Histórico de revisões do documento.....	60

Uso pretendido

O QIAamp DSP DNA Mini Kit é um sistema que usa tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para o isolamento e a purificação de DNA genômico de amostras biológicas.

O produto deve ser usado por usuários profissionais, como técnicos e médicos, especializados em técnicas biológicas moleculares.

O QIAamp DSP DNA Mini Kit deve ser usado para diagnóstico in vitro.

Descrição e princípio

O QIAamp DSP DNA Mini Kit fornece métodos rápidos e fáceis de purificação de DNA total para PCR e Southern blotting confiáveis. O DNA total (por exemplo, genômico, viral, mitocondrial) pode ser purificado de sangue total, plasma, soro, crosta inflamatória, medula óssea, outros fluidos corporais, linfócitos, células cultivadas, tecido e espécimes forenses. Os procedimentos simples de centrifugação e vácuo do QIAamp, que permitem o processamento simultâneo de várias amostras, produzem DNA purificado pronto para amplificação direta. Alguns dos procedimentos de centrifugação do QIAamp podem ser automatizados no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx para uma maior padronização e facilidade de uso. O procedimento do QIAamp é adequado para uso com sangue total fresco ou congelado e sangue que tenha sido tratado com citrato ou EDTA, mas não com heparina. A separação prévia de leucócitos não é necessária.

A purificação não requer extração de fenol/clorofórmio ou precipitação de álcool e envolve muito pouco manuseio. O DNA é eluído em tampão de eluição (AE), pronto para adição direta à PCR ou outras reações enzimáticas. Alternativamente, pode ser armazenado com segurança a -20 °C para uso posterior.

Lise com proteinase K

O QIAamp DSP DNA Mini Kit contém proteinase K, que é a enzima de escolha para tampões de lise contendo SDS usados no Protocolo de Tecido, mas com um desempenho igualmente bom no Protocolo de Sangue e Fluido Corporal. A atividade da solução de proteinase K é 600 mAU/ml da solução (ou 40 mAU/mg de proteína).

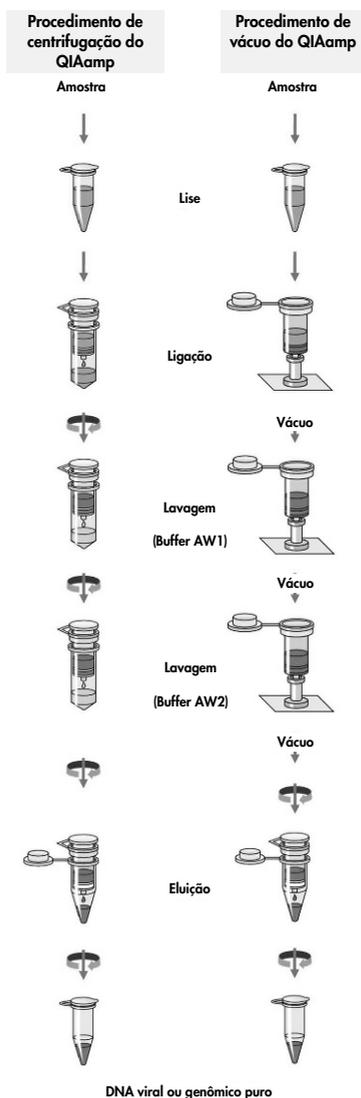


Figura 1. Procedimentos de vácuo e QIAamp DSP DNA Mini Spin

O procedimento do QIAamp DSP Spin pode ser automatizado no QIAcube e no QIAcube Connect MDx.

Purificação nas colunas de centrifugação do QIAamp Mini

O procedimento de purificação de DNA do QIAamp é realizado com o uso das colunas de centrifugação do QIAamp Mini em uma microcentrífuga padrão, em um coletor de vácuo, ou totalmente automatizado no QIAcube ou QIAcube Connect MDx (consulte a página 7) Os procedimentos foram concebidos para minimizar o potencial de contaminação cruzada entre amostras e permitem o manuseio seguro de amostras potencialmente infecciosas.

As colunas de centrifugação do QIAamp Mini cabem na maioria dos tubos da microcentrífuga padrão. No protocolo de centrifugação, dado o volume de filtrado, são necessários tubos de coleta de 2 ml (fornecidos) para sustentar a coluna de centrifugação do QIAamp Mini durante as etapas de carregamento e lavagem. Para o protocolo de vácuo são necessários um coletor de vácuo (por exemplo, coletor do QIAvac 24 Plus ou equivalente; consulte “Materiais necessários, mas não fornecidos”, a página 13) e uma bomba de vácuo capaz de produzir um vácuo de -800 a -900 mbar. O DNA eluído pode ser coletado em tubos da microcentrífuga padrão de 1,5 ml (fornecidos).

Adsorção para a membrana QIAamp

As condições de tamponamento de lisado são ajustadas para permitir uma ótima ligação do DNA à membrana QIAamp, e antes de a amostra ser carregada na coluna de centrifugação do QIAamp Mini. O DNA viral é adsorvido na membrana de sílica QIAamp durante uma etapa rápida de centrifugação ou vácuo. Os níveis de sal e de pH no lisado garantem que as proteínas e outros contaminantes, que podem inibir a PCR e outras reações enzimáticas a jusante, não sejam retidos na membrana QIAamp.

Remoção de contaminantes residuais

O DNA ligado à membrana QIAamp é lavado em 2 etapas de centrifugação ou vácuo. O uso de dois tampões de lavagem diferentes, AW1 e AW2, melhora consideravelmente a pureza do RNA eluído. As condições de lavagem garantem a remoção eficiente de qualquer contaminante residual sem afetar a ligação do RNA.

Eluição de ácidos nucleicos puros

O DNA purificado é eluído na coluna de centrifugação do QIAamp Mini em uma forma concentrada de tampão de eluição (AE). O tampão de eluição deve ser equilibrado à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de ser aplicado à coluna.

Purificação de DNA automatizada no QIAcube/QIAcube Connect MDx

Alguns protocolos do QIAamp DSP DNA Mini Kit podem ser totalmente automatizados nos instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx. O QIAcube e o QIAcube Connect MDx realizam o isolamento e a purificação automatizados de ácidos nucleicos. Eles podem processar até 12 amostras em cada execução.

O preparo de amostras usando o QIAcube e o QIAcube Connect MDx segue as mesmas etapas do procedimento manual (isto é, lise, ligação, lavagem e eluição), permitindo continuar usando o QIAamp DSP DNA Mini Kit para a purificação de DNA de alta qualidade.

Em caso de automatização do QIAamp DSP DNA Mini Kit no instrumento QIAcube, o instrumento poderá processar menos de 50 amostras devido aos volumes mortos, à evaporação e ao consumo adicional de reagentes pela pipetagem automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparos de amostras com o uso manual do QIAamp DSP DNA Mini Kit.



Figura 2. O QIAcube.



Figura 3. Purificação de DNA automatizada A purificação do DNA usando o QIAamp DSP DNA Mini Kit pode ser automatizada no QIAcube Connect MDx.

Resumo e explicação

Os QIAamp DSP DNA Mini Kits fornecem métodos rápidos e fáceis para a purificação do DNA total. O DNA total (por exemplo, genômico, viral, mitocondrial) pode ser purificado de sangue total, plasma, soro, crosta inflamatória, medula óssea, outros fluidos corporais, linfócitos, células cultivadas e tecido.

Os procedimentos simples (mostrados na Figura 1) de centrifugação e vácuo do QIAamp são adequados para o processamento simultâneo de várias amostras. Alguns dos procedimentos de centrifugação do QIAamp podem ser totalmente automatizados no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx para uma maior padronização e facilidade de uso (consulte a página 9).

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

QIAamp DSP DNA Mini Kit			
Nº de referência			61304
Número de preparações			50*
QIAamp Mini Spin	QIAamp Mini Spin Columns with Wash Tubes (QIAamp Mini Spin Columns com tubos de lavagem)		50
WT	Wash Tubes (Tubos de lavagem) (2 ml)		3 x 50
LT	Lysis Tubes (Tubos de lise) (2 ml)		50
ET	Elution Tubes (Tubos de eluição) (1,5 ml)		50
AL	Lysis Buffer (Tampão de lise) [†]		12 ml
ATL	Tampão de lise de tecido (Tissue Lysis Buffer)		10 ml
AW1	Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1 (concentrado)) [‡]		19 ml
AW2	Wash Buffer 2 (Tampão de lavagem 2 (concentrado)) [‡]		13 ml
AE	Elution Buffer (Tampão de eluição) (Coletando tampão de eluição)		22 ml
	Proteinase K		2 ml
	Instruções de uso (Manual)		

* Em caso de automatização do QIAamp DSP DNA Mini Kit no instrumento QIAcube ou QIAcube Connect MDx, é possível que o instrumento processe menos de 50 amostras devido aos volumes mortos, à evaporação e ao consumo adicional de reagentes pela pipetagem automatizada. A QIAGEN garante apenas 50 preparos de amostras com o uso manual do QIAamp DSP DNA Mini Kit.

[†] Contém sal caotrópico. Não compatível com desinfetantes que contenham alvejante. Consulte a página 15 sobre avisos e precauções.

[‡] Contém azida sódica como conservante.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

- Etanol (96 a 100%) *
- Pipetas e pontas de pipeta com barreiras de aerossol
- Microcentrífuga (com rotor para tubos de 2 ml)
- Agitador tipo vórtex
- Banho-maria ou bloco de aquecimento a 56 °C
- Tampão fosfato-salino (Phosphate-buffered saline, PBS) pode ser necessário para mais amostras

Para protocolos de vácuo

- Coletor de vácuo QIAvac 24 Plus (n° de ref. 19413) ou equivalente
- VacConnectors (n° de ref. 19407)
- Vacuum Regulator (n° de ref. 19530) para facilitar o monitoramento das pressões de vácuo e a liberação do vácuo
- Vacuum Pump (bomba de vácuo) (n° de ref. 84010) ou bomba equivalente, capaz de produzir um vácuo de -800 a -900 mbar
- Para swabs bucais ou grandes volumes: Extension Tubes (n° de ref. 19587)
- **Opcional:** VacValves (n° de ref. 19408)
- **Opcional:** QIAvac Connecting System (n° de ref. 19419)
- **Opcional:** RNase A (100 mg/ml; n° de ref. 19101)

* Não use álcool desnatado, que contém outras substâncias, como metanol ou metiletilcetona.

Apenas para o procedimento automatizado

- Rotor Adapters, n° de ref. 990394
- Rotor Adapter Holder, n° de ref. 990392
- Sample Tubes CB, n° de ref. 990382 (tubo de inserção de amostra)
- Tubos de Amostra RB, n° de ref. 990381 (tubo de entrada de amostra para DNA bacteriano, tecido)
- Shaker Rack Plugs, n° de ref. 9017854 (somente se tubos com tampa de rosca forem usados para amostras)
- Reagent Bottles, 30 ml, n° de ref. 990393
- Filter Tips, 1000 µl, n° de ref. 990352
- Filter Tips, 200 µl, n° de ref. 990332
- SafeSeal Tube, 1,5 mL, Sarstedt® (n° de ref. 72.706)

Para tecidos

- Banho-maria adicional ou bloco de aquecimento a 70 °C
- Opcional: Equipamentos para interrupção mecânica, como o TissueRuptor II® (n° de ref. 9002755) ou almofariz, pilão e nitrogênio líquido

Para swabs bucais

- Tubos da microcentrífuga de 2 ml
- Para algodão ou swabs DACRON®: Tesoura ou dispositivo de corte apropriado

Avisos e precauções

Esteja ciente de que poderá ser necessário relatar incidentes graves que tenham ocorrido em relação ao dispositivo ao fabricante e à autoridade regulatória na qual o usuário e/ou o paciente estão estabelecidos.

Informações de segurança

Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas. Elas estão disponíveis online em formato PDF compacto e conveniente em www.qiagen.com/safety, onde é possível encontrar, visualizar e imprimir a SDS para cada kit e para componente do kit QIAGEN.



CUIDADO: NÃO adicione água sanitária ou soluções ácidas diretamente nos resíduos resultantes do preparo-de amostras.

O tampão de lise (AL) e o tampão de lavagem 1 (AW1) contêm cloridrato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando misturado com água sanitária. Se for derramado líquido contendo essas soluções tamponadas, limpe com água e detergente de laboratório adequado. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpe a área afetada primeiro com água e detergente de laboratório e, em seguida, com solução de hipoclorito de sódio 1% (v/v).

Se os frascos dos tampões estiverem danificados ou apresentarem vazamento, use luvas e óculos de proteção ao descartá-los para evitar lesões em si mesmo ou em outras pessoas.

A QIAGEN não testou os resíduos líquidos gerados pelos procedimentos do QIAamp DSP DNA Mini em relação a materiais residuais infecciosos. A contaminação dos resíduos líquidos com materiais residuais infecciosos é improvável, mas não pode ser completamente excluída. Portanto, os resíduos líquidos devem ser considerados infecciosos e manipulados e descartados de acordo com os regulamentos de segurança locais.

Precauções

As seguintes afirmações de risco e precauções se aplicam a componentes do kit QIAamp DSP DNA Mini Kit.

Buffer AL



Contém: cloridrato de guanidina; ácido maleico. Aviso! Pode ser prejudicial se ingerido ou inalado. Provoca a irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Pode causar reação alérgica na pele. Se a irritação nos olhos persistir: consulte um médico. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Buffer ATL

Aviso! Causa irritação leve da pele. Se houver irritação na pele: consulte um médico.

Buffer AW1



Contém: cloridrato de guanidina. Aviso! Nocivo, se engolido ou inalado. Provoca a irritação da pele. Causa irritação grave nos olhos. Ligue para um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico, se não se sentir bem. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado. Retire a roupa contaminada e lave-a, antes de usá-la novamente. Use luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial.

Proteinase K



Contém: Proteinase K. Perigo! Causa irritação leve da pele. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Evite respirar poeira/fumaça/gás/névoa/vapores/spray. Elimine o conteúdo/recipiente em um local de eliminação de resíduos aprovado. Se tiver sintomas respiratórios: Entre em contato com um CENTRO DE ENVENENAMENTO ou médico. SE INALADO: se houver dificuldade para respirar, leve a vítima a um local com ar livre e deixe-a em repouso em uma posição confortável para respirar. Use proteção respiratória.

Armazenamento e manuseio de reagentes

As colunas de centrifugação do QIAamp devem ser armazenadas entre 2 e 8 °C após a entrega. Quando armazenado devidamente, as colunas de centrifugação do QIAamp Mini permanecem estáveis até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit. Todos os tampões e a proteinase K podem ser conservados à temperatura ambiente (15 a 25 °C) e são estáveis até ao fim da data de validade na caixa do kit.

O tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído e o tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído permanecem estáveis até 1 ano quando conservados à temperatura ambiente (15 a 25 °C), mas apenas até o fim do prazo de validade indicado na caixa do kit.

Armazenamento e manuseio de espécimes

O procedimento do QIAamp é adequado para uso com sangue total fresco ou congelado e sangue que tenha sido tratado com citrato ou EDTA. A separação prévia de leucócitos não é necessária. A purificação não requer extração de fenol/clorofórmio ou precipitação de álcool e envolve muito pouco manuseio.

Procedimento

Pontos importantes antes de começar

- Assim que receber o kit, verifique se há algum dano nos respectivos componentes. Se os blísteres ou os frascos dos tampões estiverem danificados, entre em contato com a Assistência Técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local. Em caso de derramamento de líquidos, consulte "Avisos e precauções", página 15 Não use componentes de kits danificados, uma vez que o seu uso pode prejudicar o desempenho do kit.
- Use sempre equipamentos sem RNase.
- Troque sempre as ponteiras das pipetas entre as transferências de líquidos. Para minimizar a contaminação cruzada, recomenda-se o uso de ponteiras de pipetas com barreiras contra aerossóis.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente (15–25°C).
- Sempre use luvas descartáveis e verifique regularmente se elas não estão contaminadas com o material da amostra. Descarte as luvas se elas se contaminarem.
- Para minimizar a contaminação cruzada, abra apenas um tubo por vez.
- Não use componentes de outros kits com os kits que estiver usando no momento, a menos que os números de lote sejam idênticos.
- Evite a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Para garantir a segurança em relação a materiais potencialmente infecciosos, recomenda-se trabalhar em condições de fluxo de ar laminar até que as amostras sejam lisadas.
- Esse kit apenas deve ser usado por uma equipe treinada em práticas laboratoriais de diagnóstico in vitro.

Preparo de reagentes e tampões

Buffer AW1 * (armazenar em temperatura ambiente, 15–25 °C)

O Buffer AW1 é fornecido como um concentrado. Antes de usá-lo pela primeira vez, adicione a quantidade adequada de etanol (96 a 100%), conforme indicado no frasco. O Buffer AW1 reconstituído permanece estável durante 1 ano quando armazenado fechado à temperatura ambiente (15 a 25 °C), mas somente até a data de validade do kit.

Nota: Sempre misture o tampão de lavagem 1 (AW1) reconstituído invertendo o frasco várias vezes, antes de iniciar o procedimento.

Buffer AW2† (armazenar em temperatura ambiente 15–25 °C)

O Buffer AW2 é fornecido como um concentrado. Antes de usá-lo pela primeira vez, adicione a quantidade adequada de etanol (96 a 100%) ao concentrado de Buffer AW2, conforme indicado no frasco. O Buffer AW2 reconstituído permanece estável durante 1 ano quando armazenado fechado à temperatura ambiente (15 a 25 °C), mas somente até a data de validade do kit.

Nota: Sempre misture o Tampão de lavagem 2 (AW2) reconstituído invertendo o frasco várias vezes, antes de iniciar o procedimento.

* Contém sal caotrópico. Tome as medidas apropriadas de segurança em laboratório e use luvas durante o manuseio. Não compatível com agentes desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 15 sobre Avisos e precauções.

† Contém azida sódica como conservante.

Quantidades do material inicial

Use as quantidades do material inicial indicadas na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidades do material inicial para os procedimentos do QIAamp Mini

Amostra	Quantidade
Sangue, plasma, soro	200 μ l
Camada leucoplaquetária	200 μ l
Tecido	25 mg*
Células (diplóide)	5×10^6 células

* Ao isolar DNA do baço, devem ser usadas amostras de 10 mg.

Preparação de camada leucoplaquetária

A camada leucoplaquetária é uma fração enriquecida de leucócitos do sangue total. A preparação de uma fração de camada leucoplaquetária de sangue total é simples e rende aproximadamente de 5 a 10 vezes mais DNA do que um volume equivalente de sangue total.

Prepare a camada leucoplaquetária centrifugando o sangue total a aproximadamente 2500 x g por 10 minutos \pm 1 minuto em temperatura ambiente. Após a centrifugação, 3 diferentes frações são distinguíveis: a camada superior clara é o plasma; a camada intermediária é a camada leucoplaquetária, contendo leucócitos concentrados; e a camada inferior contém eritrócitos concentrados.

Manuseio das colunas QIAamp Mini

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as precauções indicadas a seguir são necessárias ao manusear as colunas do QIAamp Mini, a fim de evitar a contaminação cruzada entre os preparos de amostras:

- Aplique com cuidado a amostra ou solução na coluna do QIAamp Mini. Pipete a amostra na coluna do QIAamp Mini sem molhar a borda da coluna.
- Troque sempre as ponteiros das pipetas entre as transferências de líquidos. Recomenda-se o uso de ponteiros de-pipetas com barreiras contra aerossóis.
- Evite o contato da membrana da coluna do QIAamp Mini com a ponteira da pipeta.
- Após todas as etapas de agitação em vórtex pulsador, centrifugue brevemente os tubos da microcentrífuga para remover as gotas do interior das tampas.
- Abra apenas uma coluna do QIAamp Mini de cada vez e tome cuidado para evitar a geração de aerossóis.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contato entre as luvas e a amostra, troque as luvas imediatamente.

Centrifugação

Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente (15 a 25 °C).

A centrifugação das colunas do QIAamp Mini é realizada a aproximadamente $=6000 \times g$ para reduzir o ruído da centrífuga. Centrifugar a toda velocidade não afetará o rendimento do ADN. A centrifugação em velocidades mais baixas também é aceitável, desde que quase toda a solução seja transferida através da membrana QIAamp.

Ao preparar o DNA a partir de camada leucoplaquetária ou linfócitos, a centrifugação em velocidade total é recomendada para evitar o entupimento.

Processamento de colunas QIAamp Mini usando uma microcentrífuga (protocolos de centrifugação)

Feche a coluna do QIAamp Min antes de colocá-la na microcentrífuga. Centrifugue conforme descrito acima.

- Remova a coluna do QIAamp Min e o tubo de coleta da microcentrífuga. Coloque a coluna do QIAamp Mini em um novo tubo de coleta. Descarte o tubo de coleta e o filtrado. Observe que o filtrado pode conter resíduos nocivos, pelo que deve ser descartado adequadamente.
- Abra apenas uma coluna do QIAamp Mini de cada vez e tome cuidado para evitar a geração de aerossóis.
- Para um processamento paralelo eficiente de múltiplas amostras, preencha um rack com tubos de coleta para os quais as colunas do QIAamp Mini podem ser transferidas após a centrifugação. Os tubos de coleta usados contendo o filtrado podem ser descartados, enquanto os novos tubos de coleta contendo as colunas QIAamp Min podem ser colocados diretamente na microcentrífuga.

○ QIAvac 24 Plus

O QIAvac 24 Plus foi criado para processamento a vácuo rápido e eficiente de até 24 colunas de centrifugação QIAGEN em paralelo. As amostras e soluções de lavagem são retiradas pelas membranas da coluna por vácuo, em vez de centrifugação, proporcionando uma maior velocidade e menos tempo de manipulação- em procedimentos de purificação.

Em combinação com o QIAvac Connecting System (opcional), o QIAvac 24 Plus pode ser usado como sistema de passagem. A passagem da amostra é coletada em um frasco de resíduos separado.

Para manutenção do QIAvac 24 Plus, consulte as diretrizes de manuseio no *Manual do QIAvac 24 Plus*.

Processamento das colunas do QIAamp Mini no QIAvac 24 Plus (protocolos de vácuo)

As colunas de centrifugação do QIAamp Mini são processadas no QIAvac 24 Plus usando VacConnectors descartáveis e VacValves reutilizáveis. VacValves (opcionais) são inseridas diretamente nos slots luer do coletor do QIAvac 24 Plus e garantem uma taxa de fluxo constante, facilitando o processamento de amostras de diferentes naturezas (por exemplo, sangue e fluidos do sangue), volumes ou viscosidades. Elas devem ser usadas se as taxas de fluxo da amostra diferirem significativamente, para garantir um vácuo consistente. Os VacConnectors são conectores descartáveis que se encaixam entre as colunas do QIAamp Mini e as VacValves ou entre as colunas do QIAamp Mini e os slots luer do QIAvac 24 Plus. Eles impedem o contato direto entre a coluna de centrifugação e a VacValve durante a purificação e reduzem o risco de contaminação cruzada entre amostras. Os VacConnectors são descartados depois de um único uso.

Diretrizes de manuseio para o QIAvac 24 Plus

- Sempre coloque o QIAvac 24 Plus em uma bancada ou área de trabalho segura. Em caso de queda, o coletor QIAvac 24 Plus pode rachar.
- Guarde sempre o QIAvac 24 Plus limpo e seco. Para os procedimentos de limpeza consulte o *Manual do QIAvac 24 Plus*.
- Os componentes do QIAvac 24 Plus não são resistentes a certos solventes (Tabela 2). Se esses solventes forem derramados na unidade, lave completamente com água.
- Para garantir desempenho consistente, não aplique silicone ou graxa a vácuo em nenhuma peça do coletor QIAvac 24 Plus.
- Tenha sempre cuidado e use óculos de segurança ao trabalhar próximo a um coletor a vácuo sob pressão.
- Entre em contato com a Assistência técnica da QIAGEN ou com o distribuidor local, para obter informações com relação a peças sobressalentes ou de reposição.

- A pressão do vácuo é o diferencial de pressão entre a parte interna do coletor de vácuo e a atmosfera (pressão atmosférica padrão de 1013 milibares ou 760 mm Hg) e pode ser medida usando o QIAvac Connecting System ou um regulador de vácuo (consulte a Figura 1). O protocolo de vácuo requer uma bomba de vácuo capaz de produzir um vácuo de -800 a -900 mbar (por ex., QIAGEN Vacuum Pump). Pressões de vácuo maiores devem ser evitadas. O uso de pressões de vácuo menores que o recomendado pode reduzir o rendimento do DNA e a pureza e aumentar a frequência de entupimento de membranas.

Tabela 2. Propriedades de resistência química do QIAvac 24 Plus

	Resistente a:	Não resistente a:
Ácido acético	Sais caotrópicos	Benzeno
Ácido crômico	Álcoois concentrados	Fenol
SDS	Cloreto de sódio	Clorofórmio
Tween® 20	Ureia	Tolueno
Água sanitária	Ácido clorídrico	Éteres
Hidróxido de sódio		

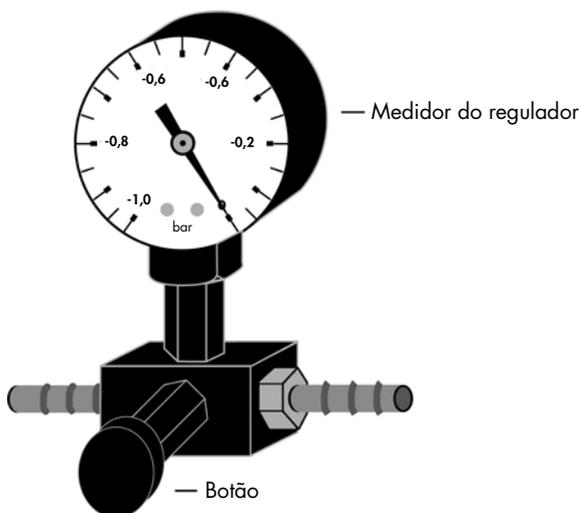


Figura 4. Diagrama esquemático do Vacuum Regulator.

Configuração do coletor de vácuo QIAvac 24 Plus

1. Conecte o QIAvac 24 Plus a uma fonte de vácuo. Se estiver usando o QIAvac Connecting System, conecte o sistema ao coletor e à fonte de vácuo, conforme descrito no "Apêndice A" do *Manual do QIAvac 24 Plus*.

2. **Recomendado:** Insira uma VacValve em cada slot luer do QIAvac 24 Plus que será usado (consulte a Figura 4).

As VacValves devem ser usadas se as taxas de fluxo das amostras diferirem significativamente, para garantir um vácuo consistente.

3. Insira um VacConnector em cada VacValve (consulte a Figura 4).

Execute essa etapa diretamente antes de iniciar a purificação, para evitar a exposição de VacConnectors a possíveis contaminantes presentes no ar.

4. Coloque as colunas do QIAamp Mini nos VacConnectors no coletor (consulte a Figura 4).

5. Se necessário, insira um tubo de extensão em cada coluna do QIAamp Mini (consulte a Figura 5).

Os tubos de extensão são necessários para processar swabs bucais ou grandes volumes.

6. Para purificação de ácidos nucleicos, siga as instruções no protocolo de vácuo. Descarte os VacConnectors corretamente, depois do uso.

Dixe a tampa da coluna do QIAamp Mini aberta, enquanto aplica o vácuo. Desligue o vácuo entre as etapas, para garantir que um vácuo consistente e constante seja aplicado durante o processamento. Para uma liberação de vácuo mais rápida, um regulador de vácuo deve ser usado (consulte a Figura 3).

Nota: Cada VacValve pode ser fechada individualmente quando a amostra tiver sido completamente retirada pela coluna de centrifugação, permitindo o processamento paralelo de amostras de diferentes volumes ou viscosidades.

7. Depois do processamento de amostras, limpe o QIAvac 24 Plus (consulte "Limpeza e descontaminação do QIAvac 24 Plus" no *Manual do QIAvac 24 Plus*).

Nota: Os Buffers AL e AW1 usados no procedimento do QIAamp DSP DNA Mini não são compatíveis com agentes desinfetantes que contenham água sanitária. Consulte a página 15 sobre Avisos e precauções.

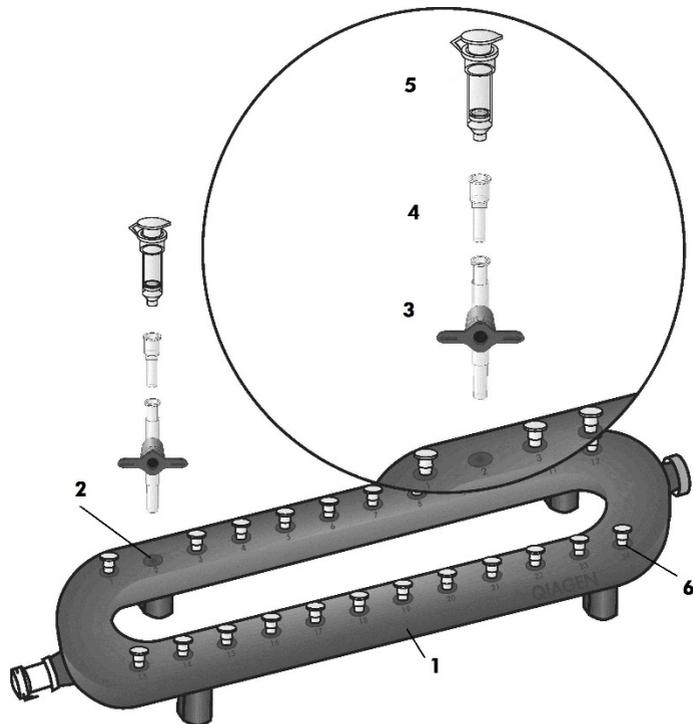


Figura 5. Configuração do QIAvac 24 Plus com as colunas do QIAamp Mini usando VacValves e VacConnectors.

1. Coletor de vácuo QIAvac 24 Plus

2. Slot luer do QIAvac 24 Plus

3. VacValve*

4. VacConnector*

5. Coluna do QIAamp

6. Slot luer fechado com plug luer

* Deve ser adquirida separadamente.

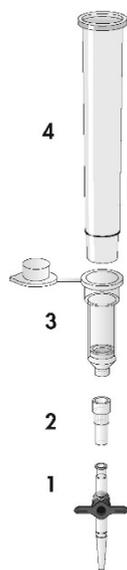


Figura 6. Conjunto de colunas do QIAamp Mini com tubos de extensão (para swabs bucais ou grandes volumes)

1. VacValve*
2. VacConnector*
3. Coluna QIAamp Mini
4. Tubo de extensão*

* Deve ser adquirida separadamente.

Processamento das colunas do QIAamp Mini no QIAcube

A preparação da amostra usando o QIAcube segue as mesmas etapas do procedimento manual (ou seja, lisar, ligar, lavar e eluir). Para obter mais informações sobre o procedimento automatizado, consulte a ficha de protocolo pertinente, disponível em www.qiagen.com/qiacubeprotocols.

Copurificação de RNA

As colunas de centrifugação QIAamp Mini copurificam o DNA e o RNA quando ambos estão presentes na amostra. Se for necessário o DNA genômico livre de RNA, 4 µl de uma solução estoque de RNase A (100 mg/ml) devem ser adicionados à amostra antes da adição do Buffer AL. RNase A não é fornecido com os kits e deve ser adquirido separadamente (consulte Materiais necessários, mas não fornecidos, página 13) Certifique-se de que o RNase A usado esteja livre de atividade de DNase.

Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx

Este protocolo é para purificação de DNA total (genômico, mitocondrial e viral) de sangue total, plasma, soro, camada leucoplaquetária, linfócitos e fluidos corporais usando uma microcentrífuga ou por automação em instrumentos QIAcube ou QIAcube Connect MDx. Para purificação total de DNA usando um coletor de vácuo, consulte "Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais (protocolo de vácuo)", página 32.

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- O processamento automatizado de 2–10 ou 12 amostras pode ser realizado nos instrumentos QIAcube.
- Para a automação, siga as instruções das fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e o Manual do usuário do *QIAcube* ou *QIAcube Connect MDx*.

O que fazer antes de começar

- Equilibre as amostras à temperatura ambiente.
- Aqueça um banho-maria ou bloco de aquecimento a 56 °C para usá-lo na etapa 4.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição na etapa 11.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a 56 °C ± 3 °C.

Procedimento

- Para o procedimento manual com uma microcentrífuga, siga as etapas 1–11.
 - Este procedimento pode ser automatizado em duas versões diferentes:
 - Padrão: automação completa começando pela etapa 1
 - Lise manual: parcialmente automatizada com lise manual fora do equipamento (começando após a etapa 5)
1. Pipete 20 µl de proteinase K para o fundo do tubo de lise.
 2. Adicione 200 µl de amostra ao tubo de lise. Use até 200 µl de sangue total, plasma, soro, camada leucoplaquetária ou fluidos corporais, ou até 5×10^6 linfócitos em 200 µl de PBS. As colunas de centrifugação QIAamp Mini copurificam o RNA e o DNA quando ambos estão presentes na amostra. Se for necessário o DNA genômico livre de RNA, 4 µl de uma solução estoque de RNase A (100 mg/ml) devem ser adicionados à amostra antes da adição do Buffer AL.

Nota: É possível adicionar proteinase K a amostras que já foram dispensadas em tubos de microcentrífuga. Nesse caso, é importante garantir a mistura adequada após a adição da enzima.

3. Adicione 200 µl de Buffer AL à amostra. Misture por agitação em vórtex pulsador durante ≥ 15 s.

Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Buffer AL sejam completamente misturados, para produzir uma solução homogênea.

Nota: Não adicione proteinase K diretamente ao Buffer AL.

4. Incube a $56 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos ± 1 minuto.
5. Centrifugar brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, para remover as gotas de dentro da tampa.

Nota: Se a lise manual (etapas 1–5) tiver sido realizada fora do equipamento, as seguintes etapas (etapas 6–11) podem ser automatizadas no QIAcube ou no QIAcube Connect MDx seguindo as instruções na tela do instrumento para o Protocolo. Blood or Body Fluid Manual Lysis.

6. Adicione 200 µl de etanol (96–100%) à amostra e misture por agitação em vórtex pulsador por ≥15 s. Após misturar, centrifugue brevemente o tubo de microcentrifuga de 1,5 ml para remover as gotas de dentro da tampa.

7. Aplique cuidadosamente a mistura da solução da etapa 6 na coluna do QIAamp Mini (em um tubo de coleta de 2 ml) sem umedecer a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥1 min. Coloque a coluna do QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (WT) de 2 ml e descarte o tubo contendo o filtrado.

Feche todas as colunas de centrifugação para evitar a formação de aerossol durante a centrifugação.

A centrifugação é realizada a aproximadamente 6000 x g a fim de limitar o ruído da microcentrifuga. A centrifugação à velocidade máxima não afetará o rendimento ou a pureza do DNA viral. Se o lisado não tiver passado completamente pela coluna após a centrifugação, centrifugue novamente a uma velocidade maior até esvaziar a coluna de centrifugação do QIAamp Min.

Nota: Ao preparar o DNA a partir de camada leucoplaquetária ou linfócitos, a centrifugação em velocidade total é recomendada para evitar o entupimento.

8. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW1 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥1 min. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (fornecido) de 2 ml e descarte o tubo de coleta contendo o filtrado.*

9. Abra cuidadosamente a coluna do QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW2 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g) durante 3 min ± 30 s.

10. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um novo tubo de lavagem de 2 ml e descarte o tubo de coleta antigo contendo o filtrado. Centrifugue à velocidade máxima por ≥ 1 min.

* O fluxo contínuo contém Buffer AL ou Tampão AW1 e, portanto, não é compatível com a lixívia. Consulte a página 15 sobre Avisos e precauções.

Esta etapa ajuda a minimizar a chance de possível carryover do Buffer AW2.

11. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de eluição (fornecido), e descarte o tubo de coleta contendo o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 200 µl de tampão de eluição (AE). Incube à temperatura ambiente durante 1 min e centrifugue à aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min.

Nota importante: Nos procedimentos automatizados, remova os eluatos do instrumento diretamente após terminar a execução e armazene-os adequadamente.

Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais (protocolo de vácuo)

Este protocolo é para purificação de DNA total (genômico, mitocondrial e viral) de sangue total, plasma, soro, linfócitos e fluidos corporais usando o QIAvac 24 Plus ou coletor de vácuo equivalente. Para purificação total de DNA usando um microcentrífuga, consulte "Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx", página 28.

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- Para configuração do QIAvac 24 Plus, consulte a página 25.
- Desligue o vácuo entre as etapas, para garantir que um vácuo consistente e constante seja aplicado durante as etapas do protocolo.

○ que fazer antes de começar

- Equilibre as amostras à temperatura ambiente.
- Aqueça um banho-maria ou bloco de aquecimento a 56 °C para usá-lo na etapa 4.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição na etapa 11.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a 56 °C ± 3 °C.

Procedimento

1. Pipete 20 µl de proteinase K para o fundo do tubo de lise.
2. Adicione 200 µl de amostra ao tubo de lise. Use até 200 µl de sangue total, plasma, soro, ou fluidos corporais, ou até 5 x 10⁶ linfócitos em 200 µl de PBS.

Se o volume da amostra for inferior a 200 µl, adicione o volume apropriado de PBS.

As colunas do QIAamp Mini copurificam o RNA e o DNA quando ambos estão presentes na amostra. O RNA pode inibir algumas reações enzimáticas a jusante, mas não a PCR. Se for necessário DNA genômico livre de RNA, 4 µl de uma solução estoque de RNase A (100 mg/ml) devem ser adicionados à amostra antes da adição do Buffer AL.

Nota: É possível adicionar proteinase K a amostras que já foram dispensadas em tubos de microcentrífuga. Nesse caso, é importante garantir a mistura adequada após a adição da enzima.

3. Adicione 200 µl de Buffer AL à amostra. Misture por agitação em vórtex pulsador durante ≥ 15 s.

Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Buffer AL sejam completamente misturados, para produzir uma solução homogênea.

Nota: Não adicione proteinase K diretamente ao Buffer AL.

4. Incube a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos ± 1 minuto.
5. Centrifugar brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, para remover as gotas de dentro da tampa.
6. Adicione 200 µl de etanol (96–100%) à amostra e misture novamente por agitação em vórtex pulsador por ≥ 15 s. Após misturar, centrifugue brevemente o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para remover as gotas de dentro da tampa.
7. Insira a coluna do QIAamp Mini em um VacConnector no coletor de vácuo do QIAvac. Aplique cuidadosamente a mistura da etapa 6 na coluna de centrifugação do QIAamp Mini sem molhar a borda. Ligue a bomba de vácuo. Certifique-se de deixar a tampa da coluna do QIAamp Mini aberta enquanto aplica o vácuo. Depois de todos os lisados terem sido puxados pela coluna de centrifugação, desligue a bomba de vácuo.
O tubo de coleta do blíster pode ser guardado para a centrifugação da etapa 10.

Se nesta etapa toda a solução não tiver passado pela membrana, coloque a coluna do QIAamp Mini em um tubo de coleta de 2 ml limpo (fornecido), feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g por ≥ 3 min ou até que todos os líquidos tenham passado completamente. Coloque a coluna do QIAamp Mini em outro tubo de coleta limpo de 2 ml, e descartar o tubo contendo o filtrado.* Continue com a etapa 8 do protocolo de microcentrifuga, página 30.

8. Aplique cuidadosamente 750 μ l do Buffer AW1 na coluna do QIAamp Mini sem umedecer a borda. Deixe a tampa da coluna do QIAamp aberta e ligue a bomba de vácuo.

Quando todo o Buffer AW1 tiver sido retirado completamente pela coluna do QIAamp Mini, desligue a bomba de vácuo.

9. Adicione 750 μ l de Buffer AW2 sem molhar a borda da coluna do QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna do QIAamp aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o Buffer AW2 tiver sido retirado completamente pela coluna do QIAamp Mini, desligue a bomba de vácuo.

10. Feche a tampa da coluna do QIAamp Mini, remova-a do coletor de vácuo e descarte o VacConnector. Coloque a coluna do QIAamp Mini em um tubo de lavagem de 2 ml limpo e centrifugue a aproximadamente 20.000 x g por ≥ 1 min para secar a membrana completamente.

11. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de eluição (fornecido). Descarte o tubo de coleta contendo o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna do QIAamp Mini. Adicione 200 μ l de tampão de eluição (AE) e equilibre à temperatura ambiente. Incube à temperatura ambiente durante 1 min e centrifugue à aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min.

* O fluxo contínuo contém Buffer AL ou Buffer AW1 e, portanto, não é compatível com a lixívia.

Protocolo: Purificação de DNA de tecidos usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx

Para purificação de DNA total (genômico, mitocondrial e viral) de tecidos usando uma microcentrífuga ou automação no QIAcube/QIAcube Connect MDx

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- Evite congelar e descongelar repetidamente as amostras armazenadas, pois isso leva à redução do tamanho do DNA.
- Tecidos transcricionalmente ativos, como fígado e rim, contêm altos níveis de RNA que se copurificam com o DNA genômico. O RNA pode inibir algumas reações enzimáticas a jusante, mas não inibirá a PCR. Se o DNA genômico livre de RNA for necessário, inclua o digest de RNase A, conforme descrito na etapa 5a do protocolo.
- O processamento automatizado de 2–10 ou 12 amostras pode ser realizado nos instrumentos QIAcube ou QIAcube Connect MDx.
- Para a automação, siga as instruções das fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e o *Manual do usuário do QIAcube ou QIAcube Connect MDx*.

O que fazer antes de começar

- Equilibre a amostra à temperatura ambiente.
- Aqueça 2 banhos-maria ou blocos de aquecimento: um a 56 °C para uso na etapa 3 e um a 70 °C para uso na etapa 5.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição na etapa 11.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer ATL ou Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a 56 °C ± 3 °C.

Procedimento

- Para o procedimento manual com uma microcentrífuga, siga as etapas 1–12.
 - Este procedimento pode ser parcialmente automatizado a partir da etapa 5b.
1. Prepare a alíquota da amostra de tecido ou a remova do armazenamento. Determine a quantidade de tecido. Não use mais do que 25 mg (10 mg de baço).

Pesar o tecido é a maneira mais precisa de determinar a quantidade.

Se o DNA for preparado a partir de tecido do baço, não devem ser usados mais do que 10 mg.

O rendimento do DNA dependerá da quantidade e do tipo de tecido processado.
 2. Cortar (etapa 2a), moer (etapa 2b), ou interromper mecanicamente (etapa 2c) a amostra de tecido.

O procedimento do QIAamp não requer interrupção mecânica da amostra de tecido, mas o tempo de lise será reduzido se a amostra for reduzida em nitrogênio líquido (etapa 2b) ou mecanicamente homogeneizado (etapa 2c) antecipadamente.

 - 2a. Corte até 25 mg de tecido (até 10 mg de baço) em pedaços pequenos. Coloque no tubo de lise e adicione 180 µl de Buffer ATL. Prossiga para a etapa 3.

É importante cortar o tecido em pequenos pedaços para diminuir o tempo de lise.
 - 2b. Coloque até 25 mg de tecido (10 mg de baço) em nitrogênio líquido e moa bem com um almofariz e pilão. Decante o pó de tecido e o nitrogênio líquido no tubo de lise. Deixe o nitrogênio líquido evaporar (não deixe o tecido descongelar) e adicione 180 µl de Buffer ATL. Prossiga para a etapa 3.
 - 2c. Adicione até 25 mg de tecido (10 mg de baço) ao tubo de lise contendo no máximo 80 µl de PBS. Homogeneíze a amostra usando o TissueRuptor ou homogeneizador rotor-estator equivalente. Adicione 100 µl de Buffer ATL e prossiga com a etapa 3.

Alguns tecidos exigem o Buffer ATL não diluído para a lise completa. Nesse caso, recomenda-se a moagem em nitrogênio líquido. As amostras não podem ser homogeneizadas diretamente no Buffer ATL, que contém detergente.

3. Adicione 20 µl de proteinase K, misture em vórtex e incube a $56^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ até que o tecido esteja completamente lisado. Misture com agitador vórtex ocasionalmente durante a incubação para dispersar a amostra, ou coloque em banho-maria com agitação ou em uma plataforma de balanço.

O tempo de lise varia dependendo do tipo de tecido processado. A lise geralmente é concluída em 1–3 h. A lise noturna é possível e não influencia a preparação. Para garantir uma lise eficiente, deve-se usar um banho-maria com agitação ou uma plataforma de balanço. Se não estiver disponível, recomenda-se agitar de 2 a 3 vezes por hora durante a incubação.

4. Centrifugue brevemente o tubo de lise para remover as gotas de dentro da tampa.
5. Se o DNA genômico livre de RNA for necessário, siga a etapa 5a. Caso contrário, siga a etapa 5b.

Tecidos transcricionalmente ativos, como fígado e rim, contêm altos níveis de RNA que se copurificam com o DNA genômico. O RNA pode inibir algumas reações enzimáticas a jusante, mas não inibirá a PCR.

- 5a. Adicione 4 µl de RNase A (100 mg/ml), misture por agitação em vórtex pulsador por ≥ 15 s e incube por $2 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$ em temperatura ambiente. Centrifugue rapidamente o tubo de lise para remover as gotas de dentro da tampa antes de adicionar 200 µl de Buffer AL à amostra. Misture novamente por agitação em vórtex pulsador por ≥ 15 s e incube a $70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por $10 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$. Centrifugue rapidamente o tubo de lise para remover as gotas de dentro da tampa.

É essencial que a amostra e o Buffer AL tamponada sejam completamente misturadas, para produzir uma solução homogênea.

Pode ocorrer formação de um precipitado branco ao adicionar Buffer AL. Na maioria dos casos, ele se dissolve durante a incubação a $70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. O precipitado não interfere com o procedimento do QIAamp ou com qualquer aplicação subsequente.

Nota: As seguintes etapas (etapas 5b-12) podem ser automatizadas no QIAcube ou QIAcube Connect MDx. Para QIAcube Connect MDx, siga as instruções na tela do instrumento para o Protocolo: Tissue_Standard

5b. Adicione 200 µl de Buffer AL à amostra, misture por agitação em vortéx pulsador por ≥ 15 s e incube a $70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por $10 \text{ min} \pm 1 \text{ min}$. Centrifugue rapidamente o tubo de lise para remover as gotas de dentro da tampa.

É essencial que a amostra e o Buffer AL tamponada sejam completamente misturadas, para produzir uma solução homogênea.

Um precipitado branco pode se formar com a adição do Buffer AL que, na maioria dos casos, dissolve-se durante a incubação a $70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. O precipitado não interfere com o procedimento do QIAamp ou com qualquer aplicação subsequente.

Nota: As seguintes etapas (etapas 6-12) podem ser automatizadas no QIAcube ou QIAcube Connect MDx.

6. Adicione 200 µl de etanol (96–100%) à amostra e misture por agitação em vórtex pulsador por ≥ 15 s. Após misturar, centrifugue brevemente o tubo de lise para remover as gotas de dentro da tampa.

É essencial que a amostra, o Buffer AL e o etanol sejam completamente misturados, para produzir uma solução homogênea.

Pode ocorrer formação de um precipitado branco ao adicionar etanol. É essencial aplicar todo o precipitado à coluna de centrifugação do QIAamp Mini. Este precipitado não interfere com o procedimento QIAamp ou com qualquer aplicação subsequente.

Não use álcoois que não sejam etanol, pois isso pode resultar em rendimentos reduzidos.

7. Aplique cuidadosamente a mistura da etapa 6 (incluindo o precipitado) na coluna de centrifugação do QIAamp Mini (em um tubo de lavagem de 2 ml) sem molhar o aro. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente $6000 \times g$ durante ≥ 1 min. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (WT) de 2 ml e descarte o tubo contendo o filtrado.*

Feche todas as colunas de centrifugação para evitar a formação de aerossol durante a centrifugação.

É essencial aplicar todo o precipitado à coluna de centrifugação do QIAamp Mini.

* O fluxo contínuo contém Buffer AL ou Buffer AW1 e, portanto, não é compatível com a lixívia. Consulte a página 15 sobre Avisos e precauções.

A centrifugação é realizada a aproximadamente 6000 x g para reduzir o ruído. A centrifugação à velocidade máxima não afetará o rendimento ou a pureza do DNA viral. Se a solução não tiver atravessado completamente a membrana, centrifugue novamente a uma velocidade mais alta até toda a solução tê-la atravessado.

8. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW1 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (fornecido) de 2 ml e descarte o tubo antigo contendo o filtrado.
9. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW2 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g) durante 3 min \pm 30 s.
10. **Recomendado:** Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um novo tubo de coleta de 2 ml (fornecido) e descarte o tubo de coleta antigo contendo o filtrado. Centrifugue à velocidade máxima por ≥ 1 min.

Esta etapa ajuda a minimizar a chance de possível carryover do Buffer AW2.

11. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de eluição limpo de 1,5 ml, e descarte o tubo de coleta contendo o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 200 µl de tampão de eluição (AE). Incube à temperatura ambiente durante ≥ 1 min e centrifugue à aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min.
12. Repita a etapa 11.

Nota importante: Para procedimentos automatizados, remova os eluatos do instrumento diretamente após terminar a execução e armazene-os adequadamente.

Protocolo: Purificação de DNA de swabs bucais (protocolo de centrifugação)

Este protocolo é para purificação de DNA total (genômico, mitocondrial e viral) de swabs bucais usando uma microcentrífuga. Para purificação total de DNA usando um coletor de vácuo, consulte "Protocolo: Purificação de DNA de swabs bucais (protocolo de vácuo)" na página 43.

Pontos importantes antes de começar

- Devido ao aumento do volume de Buffer AL que é necessário para o protocolo de swab bucal, menos preparações podem ser realizadas.
- Este protocolo é recomendado para os seguintes tipos de swabs: C.E.P. (Omni Swabs da Whatman® Bioscience), algodão e DACRON (Daigger, aplicadores Puritan® com bastão de plástico e algodão ou ponta DACRON da Hardwood Products Company ou da Hain Diagnostika).
- Para coletar uma amostra, raspe o swab firmemente contra a parte interna de cada bochecha 6 vezes. -Seque ao ar ambiente o swab por pelo menos 2 horas após a coleta. Certifique-se de que a pessoa que forneceu a amostra não consumiu nenhum alimento ou bebida nos 30 minutos anteriores à coleta da amostra.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.

O que fazer antes de começar

- Prepare o banho-maria de $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso na etapa 3.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição na etapa 9.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Procedimento

1. Coloque o swab bucal no tubo de lise de 2 ml. Adicione 400 µl (swab de algodão e DACRON) ou 600 µl (Omni Swab) de PBS à amostra.

O Omni Swab é ejetado no tubo pressionando a extremidade da haste em direção ao swab. Os swabs de algodão ou DACRON são separados da vareta manualmente ou com uma tesoura. As colunas de centrifugação QIAamp Mini copurificam o RNA e o DNA em paralelo quando ambos estão presentes na amostra. O RNA pode inibir algumas reações enzimáticas a jusante, mas não a PCR. Se for necessário o DNA genômico livre de RNA, 4 µl de uma solução estoque de RNase A (100 mg/ml) devem ser adicionados à amostra antes da adição do Buffer AL.

2. Adicione 20 µl de proteinase K e 400 µl (algodão ou swab DACRON) ou 600 µl (Omni Swab) de Buffer AL à amostra. Misture imediatamente em vórtex por ≥ 15 segundos.

Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Buffer AL sejam misturados imediatamente e por complet.

Nota: Não adicione proteinase K diretamente ao Buffer AL.

3. Incube a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $10\text{ min} \pm 1\text{ min}$. Centrifugue brevemente para remover as gotas de dentro da tampa.
4. Adicione 400 µl (swab de algodão ou DACRON) ou 600 µl (Omni Swab) de etanol (96–100%) à amostra e misture novamente em vórtex. Centrifugue brevemente para remover as gotas de dentro da tampa.
5. Aplique cuidadosamente 700 µl da mistura da etapa 4 na coluna de centrifugação do QIAamp Mini (em um tubo de lavagem de 2 ml) sem umedecer a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente $6000 \times g$ durante $\geq 1\text{ min}$. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (WT) de 2 ml e descarte o tubo contendo o filtrado. *

Feche todas as colunas de centrifugação para evitar a formação de aerossol durante a centrifugação.

* O fluxo contínuo contém Buffer AL ou Buffer AW1 e, portanto, não é compatível com a lixívia. Consulte a página 15 sobre Avisos e precauções.

6. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW1 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de lavagem limpo (WT) de 2 ml e descarte o tubo contendo o filtrado.*
7. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 500 µl de Buffer AW2 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue à velocidade máxima (aproximadamente 20.000 x g) durante 3 min \pm 30 s.
8. **Recomendado:** Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um novo tubo de lavagem de 2 ml e descarte o tubo de coleta antigo contendo o filtrado. Centrifugue à velocidade máxima por ≥ 1 min.

Esta etapa ajuda a minimizar a chance de possível carryover do Buffer AW2.
9. Coloque a coluna de centrifugação do QIAamp Mini em um tubo de eluição limpo (ET) (fornecido). Descarte o tubo de lavagem contendo o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna de centrifugação do QIAamp Mini e adicione 150 µl de tampão de eluição (AE). Incube à temperatura ambiente durante ≥ 1 min e centrifugue à aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min.

* O fluxo contínuo contém Buffer AL ou Buffer AW1 e, portanto, não é compatível com a lixívia. Consulte a página 15 sobre Avisos e precauções.

Protocolo: Purificação de DNA de swabs bucais (protocolo de vácuo)

Este protocolo é para purificação de DNA total (genômico, mitocondrial e viral) de swabs bucais usando uma microcentrifuga. Para purificação total de DNA usando um coletor de vácuo, consulte "Protocolo: Purificação de DNA de swabs bucais (protocolo de centrifugação)", página 40.

Pontos importantes antes de começar

- Devido ao aumento do volume de Buffer AL que é necessário para o protocolo de swab bucal, menos preparações podem ser realizadas.
- Este protocolo é recomendado para os seguintes tipos de swabs: C.E.P. (Omni Swabs da Whatman Bioscience), algodão e DACRON (Daigger, aplicadores Puritan com bastão de plástico e algodão ou ponta DACRON da Hardwood Products Company ou da Hain Diagnostika).
- Para coletar uma amostra, raspe o swab firmemente contra a parte interna de cada bochecha 6 vezes. -Seque ao ar ambiente o swab por pelo menos 2 horas após a coleta. Certifique-se de que a pessoa que forneceu a amostra não consumiu nenhum alimento ou bebida nos 30 minutos anteriores à coleta da amostra.
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- Para configuração do QIAvac 24 Plus, consulte a página 25.
- Desligue o vácuo entre as etapas, para garantir que um vácuo consistente e constante seja aplicado durante as etapas do protocolo.

O que fazer antes de começar

- Prepare o banho-maria de $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso na etapa 3.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) ou água destilada à temperatura ambiente para eluição na etapa 9.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Procedimento

1. Coloque o swab bucal no tubo de lise de 2 ml. Adicione 400 µl (swab de algodão e DACRON) ou 600 µl (Omni Swab) de PBS à amostra.

O Omni Swab é ejetado no tubo pressionando a extremidade da haste em direção ao swab. Os swabs de algodão ou DACRON são separados da vareta manualmente ou com uma tesoura. As colunas de centrifugação QIAamp Mini copurificam o RNA e o DNA em paralelo quando ambos estão presentes na amostra. O RNA pode inibir algumas reações enzimáticas a jusante, mas não a PCR. Se for necessário o DNA genômico livre de RNA, 4 µl de uma solução estoque de RNase A (100 mg/ml) devem ser adicionados à amostra antes da adição do Buffer AL.

2. Adicione 20 µl de solução estoque de proteinase K e 400 µl (algodão ou swab DACRON) ou 600 µl (Omni Swab) de Buffer AL à amostra. Misture imediatamente em vórtex por ≥ 15 segundos.

Para garantir uma lise eficiente, é essencial que a amostra e o Buffer AL sejam misturados imediatamente e por complet.

Nota: Não adicione proteinase K diretamente ao Buffer AL.

3. Incube a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $10\text{ min} \pm 1\text{ min}$. Centrifugue brevemente para remover as gotas de dentro da tampa.
4. Adicione 400 µl (swab de algodão ou DACRON) ou 600 µl (Omni Swab) de etanol (96–100%) à amostra e misture novamente em vórtex.
5. Insira a coluna do QIAamp Mini em um VacConnector no coletor de vácuo do QIAvac. Coloque um tubo de extensão (consulte Informações sobre pedidos, página 58) na coluna. Vede os adaptadores luer não usados com plugues luer.
6. Aplique a mistura da etapa 4 na coluna do QIAamp Mini. Ligue a bomba de vácuo para puxar o lisado através da coluna do QIAamp Mini. Quando o lisado tiver passado completamente pela coluna do QIAamp Mini, desligue a bomba de vácuo.
7. Adicione 750 µl de Buffer AW1 ao tubo de extensão. Ligue a bomba de vácuo para puxar o Buffer AW1 através da coluna do QIAamp Mini. Desligue a bomba a vácuo. Remova cuidadosamente o tubo de extensão da coluna do QIAamp Mini e descarte.

8. Adicione 750 µl de Buffer AW2 sem molhar a borda da coluna do QIAamp Mini. Deixe a tampa da coluna do QIAamp aberta e ligue a bomba de vácuo. Quando todo o Buffer AW2 tiver sido retirado completamente pela coluna de centrifugação, desligue a bomba de vácuo. *
9. Feche a tampa da coluna do QIAamp Mini, remova-a do coletor de vácuo e descarte o VacConnector. Coloque a coluna do QIAamp Mini em um tubo de lavagem de 2 ml limpo e centrifugue a aproximadamente 20.000 x g por ≥ 1 min para secar a membrana completamente.
10. Coloque a coluna de QIAamp Mini em um tubo de eluição limpo (ET) (fornecido). Descarte o tubo de lavagem e o filtrado. Abra cuidadosamente a coluna do QIAamp Mini. Elua o DNA com 150 µl de tampão de eluição (AE). Incube à temperatura ambiente durante ≥ 1 min e centrifugue à aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min.

* O fluxo contínuo contém Buffer AL ou Buffer AW1 e, portanto, não é compatível com a lixívia. Consulte a página 15 sobre Avisos e precauções.

Protocolo: Purificação de DNA total de células em cultura

Este protocolo é para purificação de DNA total (genômico, mitocondrial e viral) de células cultivadas usando uma microcentrífuga.

Equipamentos e reagentes adicionais necessários

- Solução salina tamponada com fosfato (PBS) *
- Equipamento para colheita de células. Dependendo do método escolhido, um ou mais dos seguintes são necessários:
 - Microcentrífuga
 - Tripsina e meios de cultura*
 - Raspador de células

Pontos importantes antes de começar

- Não use mais de 5×10^6 células (com um conjunto normal de cromossomos).
- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.

○ que fazer antes de começar

- Aqueça um banho-maria ou bloco de aquecimento a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (Safety Data Sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Procedimento

1. Colha células de acordo com a etapa 2 (para células cultivadas em suspensão) ou etapa 3 (para células cultivadas em uma monocamada).
2. Células cultivadas em suspensão (não use mais de 5×10^6 células com um conjunto normal de cromossomos): Determine o número de células. Centrifugue o número apropriado de células por $5 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$ a aproximadamente $300 \times g$ em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Remova o sobrenadante completamente e descarte, tomando cuidado para não perturbar o grânulo celular. Continue com a etapa 4.
3. Células cultivadas em uma monocamada (não use mais de 5×10^6 células com um conjunto normal de cromossomos): As células cultivadas em uma monocamada podem ser destacadas do frasco de cultura por tripsinização ou usando um raspador de células.

Para tripsinizar células:

Determine o número de células. Aspire o meio e lave as células com PBS. Aspire o PBS e adicione 0,10–0,25% de tripsina. Após as células terem se soltado do prato ou frasco, colete-as em meio e transfira o número apropriado de células (não use mais de 5×10^6 células com um conjunto normal de cromossomos) para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (não fornecido). Centrifugue por $5 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$ a aproximadamente $300 \times g$. Remova o sobrenadante completamente e descarte, tomando cuidado para não perturbar o grânulo celular. Continue com a etapa 4.

Usando um raspador de célula:

Solte as células do prato ou frasco. Transfira o número apropriado de células (não use mais de 5×10^6 células com um conjunto normal de cromossomos) para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (não fornecido) e centrifugue por $5 \text{ min} \pm 30 \text{ s}$ a aproximadamente $300 \times g$. Remova o sobrenadante completamente e descarte, tomando cuidado para não perturbar o grânulo celular. Continue com a etapa 4.

4. Ressuspenda o grânulo celular em PBS para um volume final de 200 μl .
5. Adicione 20 μl de proteinase K.
6. Continue com a etapa 3 de "Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx", página 28.

Protocolo: Isolamento de DNA bacteriano de fluidos biológicos

Para purificação de DNA bacteriano usando uma microcentrífuga ou o QIAcube/QIAcube Connect MDx.

Algumas bactérias, particularmente bactérias Gram-positivas, requerem pré-incubação com enzimas específicas, como a lisozima* ou lisostafina (por exemplo, estafilococos) para lisar a parede celular rígida em várias camadas. Nesses casos, "Protocolo: Isolamento de DNA genômico de bactérias Gram-positivas", página 52, deve ser usado.

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- Evite congelar e descongelar repetidamente as amostras armazenadas, pois isso leva à redução do tamanho do DNA.
- O processamento automatizado de 2–10 ou 12 amostras pode ser realizado nos instrumentos QIAcube ou QIAcube Connect MDx.
- Para a automação, siga as instruções das fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e o *Manual do usuário do QIAcube ou QIAcube Connect MDx*.

O que fazer antes de começar

- Equilibre a amostra à temperatura ambiente.
- Aqueça 2 banhos-maria ou blocos de aquecimento: um a 56 °C e um a 70 °C.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer ATL ou Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a 56 °C ± 3 °C.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

Procedimento

- Para o procedimento manual com uma microcentrífuga, siga as etapas 1–3.
 - Este procedimento pode ser parcialmente automatizado a partir da etapa 2 (Protocolo: Bacterial Pellet_Bacterial DNA).
1. Coloque os grânulos com bactérias em centrifugação por 10 minutos a 5000 x *g* (7500 rpm).
 2. Ressuspenda o grânulo bacteriano em 180 µl de Buffer ATL.
 3. Siga "Protocolo: Purificação de DNA de tecidos usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx", página 35, começando na etapa 3.

Protocolo: Isolamento de DNA bacteriano do olho, nasal, faríngeo ou outros swabs

Algumas bactérias, particularmente bactérias Gram-positivas, requerem pré-incubação com enzimas específicas, como a lisozima* ou lisostafina (por exemplo, estafilococos) para lisar a parede celular rígida em várias camadas. Nesses casos, "Protocolo: Isolamento de DNA genômico de bactérias Gram-positivas", página 52, deve ser usado.

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- Evite congelar e descongelar repetidamente as amostras armazenadas, pois isso leva à redução do tamanho do DNA.

O que fazer antes de começar

- Equilibre a amostra à temperatura ambiente.
- Aqueça 2 banhos-maria ou blocos de aquecimento: um a 56 °C e um a 70 °C.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer ATL ou Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a 56 °C ± 3 °C.

Procedimento

1. Colete as amostras e coloque no tubo de lise de 2 ml.
2. Adicionar 1 ml de PBS e incubar por 2 h ± 10 min em temperatura ambiente.

* Ao trabalhar com substâncias químicas, sempre use um jaleco adequado, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as folhas de dados de segurança (safety data sheets, SDSs) apropriadas disponibilizadas pelo fornecedor do produto.

-
3. Coloque os grânulos com bactérias em centrifugação por 10 minutos a 5000 x g (7500 rpm).
 4. Ressuspenda o grânulo bacteriano em 180 µl de Buffer ATL.
 5. Siga "Protocolo: Purificação de DNA de tecidos usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx", página 36, começando na etapa 3.

Protocolo: Isolamento de DNA genômico de bactérias Gram-positivas

Para uso com uma microcentrífuga ou automatizado em instrumentos do QIAcube/QIAcube Connect MDx

Pontos importantes antes de começar

- Todas as etapas de centrifugação são realizadas à temperatura ambiente.
- Evite congelar e descongelar repetidamente as amostras armazenadas, pois isso leva à redução do tamanho do DNA.
- O processamento automatizado de 2–10 ou 12 amostras pode ser realizado nos instrumentos QIAcube ou QIAcube Connect MDx.
- Para a automação, siga as instruções das fichas de protocolo (QIAcube) ou na tela do software (QIAcube Connect MDx) e o Manual do usuário do *QIAcube* ou *QIAcube Connect MDx*.

O que fazer antes de começar

- Equilibre a amostra à temperatura ambiente.
- Aqueça 2 banhos-maria ou blocos de aquecimento: um a 56 °C e um a 95 °C.
- Equilibre o tampão de eluição (AE) à temperatura ambiente para eluição.
- Certifique-se de que o Buffer AW1 e o Buffer AW2 tenham sido preparados de acordo com as instruções na página 19.
- Em caso de formação de um precipitado no Buffer ATL ou Buffer AL, dissolva-o por meio de incubação a 56 °C ± 3 °C.
- Prepare a solução de enzima apropriada (não fornecida): 20 mg/ml de lisozima ou 200 µg/ml de lisostafina; 20 mM Tris-HCl, pH 8,0; EDTA 2 mM; 1,2% Triton®.

Procedimento

- Para o procedimento manual com uma microcentrífuga, siga as etapas 1–8.
 - Este procedimento pode ser parcialmente automatizado a partir da etapa 7 (Protocolo: Bacteria (Gram+) ou Yeast_Enzymatic Lysis)
1. Colete as amostras e coloque no tubo de lise de 2 ml.
 2. Coloque os grânulos com bactérias em centrifugação por 10 minutos a 5000 x g (75000 rpm).
 3. Suspenda o grânulo bacteriano em 180 µl da solução de enzima apropriada (20 mg/ml de lisozima ou 200 µg/ml de lisostapina em 20 mM de Tris·HCl, pH 8.0; 2 mM de EDTA; 1,2% de Triton).
 4. Incube por pelo menos 30 minutos a 37 °C.
 5. Adicione 20 µl de proteinase K e 200 µl Buffer AL. Misture agitando em vórtex.
 6. Incube a 56 °C por 30 min e, em seguida, incube a 95 °C por mais 15 min.
 7. Centrifugue por alguns segundos.
 8. Siga "Protocolo: Purificação de DNA de tecidos usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx", página 35, começando na etapa 6.

Controle de qualidade

De acordo com o sistema de gestão de qualidade com certificado ISO da QIAGEN, cada lote do QIAamp DSP DNA Mini Kit é testado relativamente a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade consistente do produto.

Limitações

O desempenho do sistema foi estabelecido usando sangue total, culturas bacterianas, e tecido para isolamento de DNA genômico.

É responsabilidade do usuário validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos usados em seu laboratório que não sejam abrangidos pelos estudos de desempenho da QIAGEN.

Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, devem ser usados controles adequados para aplicações posteriores. Para validação adicional, recomendamos as diretrizes da Conferência Internacional sobre Harmonização (CIH) de Requisitos Técnicos no documento ICH Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia).

Quaisquer resultados de diagnóstico gerados devem ser interpretados em conjunto com outros resultados clínicos ou laboratoriais.

Símbolos

Os seguintes símbolos podem aparecer nas instruções de uso ou na embalagem e na etiqueta:

Símbolo	Definição do símbolo
 <N>	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Data de validade
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
REF	Número de referência
LOT	Número de lote
MAT	Número do material (isto é, etiquetagem do componente)
COMP	Componentes
CONT	Contém
NUM	Número
GTIN	Número global de item comercial
VOL	Volume
Rn	R representa a revisão das Instruções de uso e n representa o número de revisão
	Limites de temperatura
	Resulta em

Símbolo	Definição do símbolo
	Na chegada
	Abra na entrega. Armazene as QIAamp Mini Spin Columns entre 2 °C e 8 °C
	Anotar a data atual depois de adicionar etanol ao frasco
	Etanol
	Adicionar
	Cloridrato de guanidina
	Ácido maleico
	Fabricante
	Consultar as instruções de uso
	Conservar ao abrigo da luz solar
	Aviso/cuidado

Informações de contato

Para obter assistência técnica e mais informações, consulte o nosso Centro de Suporte Técnico no site www.qiagen.com/Support (para obter as informações de contato, visite www.qiagen.com).

Informações sobre pedidos

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
QIAamp DSP DNA Mini Kit (50)	Para 50 preparos de DNA: Colunas de centrifugação do QIAamp Mini, proteinase K, Reagentes, Tampões, tubos de coleta	61304
Produtos relacionados		
QIAcube Connect MDx*	Instrumento e 1 ano de garantia em peças e mão de obra	9003070
Acessórios		
Extension Tubes (3 ml)†	Para uso com colunas de centrifugação QIAGEN em coletores de vácuo: 100 por pacote	19587
QIAvac 24 Plus vacuum manifold‡	Coletor de vácuo para processamento de 1–24 colunas de centrifugação: coletor de vácuo QIAvac 24 Plus, plugues luer, acoplamentos rápidos	19413
Vacuum Pump‡	Bomba de vácuo universal	84010
VacConnectors‡	500 conectores descartáveis para uso com colunas de centrifugação do QIAamp em conectores luer	19407
Rotor Adapters	Para 240 preparos: 240 Adaptadores de rotor descartáveis e 240 Tubos de eluição (1,5 ml); para uso com o QIAcube	990394
Rotor Adapter Holder	Suporte para 12 adaptadores de rotor descartáveis; para uso com o QIAcube	990392

Produto	Conteúdo	Nº de ref.
Sample Tubes CB	1000 tubos cônicos com tampa rosqueada sem base contornada (2 ml) para uso com o QIAcube e QIAcube Connect MDx	990382
Sample Tubes RB	1000 tubos de microcentrífuga com trava segura (2 ml) para uso com o QIAcube e QIAcube Connect	990381
Shaker Rack Plugs	Para carregar o rack do agitador do QIAcube	9017854
Reagent Bottles, 30 ml	Frascos de reagente (30 ml) com tampas; embalagem de 6; para uso com o QIAcube	990393
Filter-Tips, 1000 µl	Ponteiras com filtro descartáveis, no rack; (8 x 128). Para uso com o QIAcube	990352
Filter-Tips, 1000 µl, wide-bore	Ponteiras com filtro descartáveis, orifício largo, no rack; (8 x 128); não são necessárias para todos os protocolos. Para uso com o QIAcube	990452
Filter-Tips, 200 µl	Ponteiras com filtro descartáveis, no rack; (8 x 128). Para uso com os instrumentos QIAcube e QIASymphony SP/AS	990332

* O QIAcube Connect MDx não está disponível em todos os países. Para obter mais detalhes, entre em contato com a assistência técnica da QIAGEN.

† Para uso com cotonetes bucais ou protocolos com grandes volumes.

‡ Para uso com protocolos de vácuo.

Para obter informações de licenciamento atualizadas e isenções de responsabilidade específicas do produto, consulte o manual do usuário ou o manual do respectivo kit QIAGEN. Os manuais do usuário e os manuais de kits QIAGEN estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da QIAGEN ou ao seu distribuidor local.

Histórico de revisões do documento

Revisão	Descrição
R4, 01/2021	<p>Atualizações nas seguintes seções: Purificação de DNA automatizada no QIAcube/QIAcube Connect MDx, Materiais necessários, mas não fornecidos, Avisos e precauções, Protocolo: Purificação de DNA de sangue ou fluidos corporais usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx, Protocolo: Purificação de DNA de tecidos usando uma microcentrífuga ou instrumentos QIAcube/QIAcube Connect MDx, Protocolo: Isolamento de DNA bacteriano de fluidos biológicos, Protocolo: Isolamento de DNA genômico de bactérias Gram-positivas, Símbolos e Informações sobre pedidos.</p> <p>Remoção do protocolo para manchas de sangue seco</p> <p>Foram adicionadas referências ao QIAcube Connect MDx e seus acessórios.</p> <p>Alterações de layout e editoriais.</p>

Contrato de licença limitada para o QIAamp DSP DNA Mini Kit

O uso deste produto implica a aceitação de qualquer comprador ou usuário do produto, com os seguintes termos:

1. O produto só pode ser usado conforme os protocolos facultados com o mesmo e este manual e apenas com componentes contidos no painel. A QIAGEN não concede licença a qualquer uma de suas propriedades intelectuais para usar ou incorporar os componentes incluídos neste painel com quaisquer componentes não incluídos no mesmo, exceto conforme descrito nos protocolos facultados com o produto, neste manual e nos protocolos adicionais, disponíveis em www.qiagen.com. Alguns desses protocolos adicionais foram fornecidos pelos usuários da QIAGEN para os usuários da QIAGEN. Esses protocolos não foram testados por completo nem otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não garante nem fornece garantias de que eles não infringem os direitos de terceiros.
2. A não ser em relação às licenças expressamente indicadas, a QIAGEN não garante que este painel e/ou seu(s) uso(s) não infringem os direitos de terceiros.
3. Este painel e seus componentes estão licenciados para uso único e não podem ser reutilizados, reconstruídos ou revendidos.
4. A QIAGEN especificamente renuncia a quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, com exceção daquelas expressamente indicadas.
5. O comprador e o usuário do painel concordam em não realizar nem permitir que outra pessoa realize qualquer etapa que possa levar a ou facilitar qualquer um dos atos proibidos acima. A QIAGEN poderá fazer cumprir as proibições deste Acordo de licença exclusivo em qualquer tribunal e recuperar todas as custas processuais, incluindo os encargos com os advogados, em qualquer ação para fazer cumprir o Acordo de licença exclusivo ou quaisquer direitos de propriedade intelectual relacionados com o painel e/ou seus componentes.

Para obter os termos de licença atualizados, visite www.qiagen.com.

Marcas registradas: QIAGEN®, QIAamp®, QIAcube®, TissueRuptor® (QIAGEN Group); Tween® (ICI Americas Inc.); DACRON® (Invista North America S.A.R.L. Corporation); Puritan® (Puritan Medical Products Company); Triton® (Rohm and Haas Company); Sarstedt® (Sarstedt AG & Co.); Whatman® (Whatman International Limited Corporation). Os nomes registrados, as marcas registradas etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

01/2021 HB-0428-008 1122787 © 2021 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Assistência Técnica support.qiagen.com | Site www.qiagen.com