

Settembre 2019

QIAamp[®] DSP Circulating NA Kit Istruzioni per l'uso (manuale)

Versione 1



50

IVD

CE

REF

61504



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, D-40724 Hilden

R4 **MAT**

1118364IT

Sample to Insight



Sommario

Uso previsto	4
Sommario e spiegazioni	4
Principi della procedura	5
Volumi dei campioni	5
Lisi di campioni	7
Adsorbimento alla membrana della colonna QIAamp Mini	7
Rimozione di contaminanti residui	7
Eluizione di acidi nucleici puri	8
Resa e dimensione degli acidi nucleici	8
Descrizione dei protocolli	9
Materiali in dotazione	10
Contenuto del kit	10
Materiali necessari ma non in dotazione	11
Avvertenze e precauzioni	12
Conservazione e manipolazione dei reagenti	15
Conservazione e manipolazione dei campioni	16
Procedura	17
Preparazione di tamponi e reagenti	24
Breeze Protocol: purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano	27
Classic Protocol: Purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano	32

Controllo di qualità	37
Limitazioni	37
Simboli	38
Riferimenti	40
Informazioni di contatto	40
Guida alla risoluzione dei problemi	41
Appendice A: Raccomandazione per la separazione e la conservazione del plasma sanguigno	44
Appendice B: Note generali per il trattamento dell'RNA	46
Informazioni per gli ordini	47
Cronologia delle revisioni del manuale	48

Uso previsto

Il QIAamp DSP Circulating NA Kit è un sistema che utilizza la tecnologia su membrana di silice (tecnologia QIAamp) per l'isolamento e la purificazione di DNA e RNA liberi circolanti di campioni di plasma di sangue umano.

Questo prodotto è rivolto a utenti professionisti, quali tecnici e medici esperti in tecniche di biologia molecolare.

Il QIAamp DSP Circulating NA Kit è destinato all'uso diagnostico in vitro.

Sommario e spiegazioni

Gli acidi nucleici liberi circolanti sono presenti nel plasma umano, di solito sotto forma di piccoli frammenti, <1000 bp (DNA), <1000 nt (RNA) o addirittura 20 nt (miRNA). La concentrazione di acidi nucleici liberi circolanti nel plasma di sangue umano è solitamente bassa, e varia considerevolmente da una persona all'altra, con valori compresi tra 1 e 100 ng/ml nei campioni umani (1–5).

Il QIAamp DSP Circulating NA Kit permette un'efficace purificazione degli acidi nucleici circolanti da plasma umano. I campioni possono essere freschi o congelati. I tubi di estensione e l'estrazione sottovuoto sul QIAvac 24 Plus consentono volumi di campioni iniziali fino a 5 ml, mentre volumi di eluizione flessibili compresi tra 20 e 150 µl consentono di concentrare le specie di acido nucleico presenti in basse concentrazioni.

Il DNA o l'RNA genomico libero circolante eluito è pronto per l'uso in applicazioni a valle o adatto allo stoccaggio. Il QIAamp DSP Circulating NA Kit fornisce un'efficace rimozione di proteine, nucleasi e altre impurità.

Principi della procedura

La procedura del QIAamp DSP Circulating NA comprende 4 fasi (lisi, legame, lavaggio ed eluizione) ed è realizzata con le colonne QIAamp Mini del sistema QIAvac. Questa procedura affidabile aiuta a ridurre al minimo la contaminazione crociata tra campioni e aumenta la sicurezza dell'utente nella manipolazione di campioni potenzialmente infettivi.

La semplice procedura è adatta all'elaborazione simultanea di fino a 24 campioni in meno di 2 ore.

Volumi dei campioni

Le colonne QIAamp Mini legano acidi nucleici frammentati di appena 20 nt, ma la resa dipende dal volume di campione e dalla concentrazione di acidi nucleici circolanti nel campione (di solito 1–100 ng/ml nel plasma). La procedura del QIAamp DSP Circulating NA è stata ottimizzata per volumi di campione di 5 ml.

Procedura del QIAamp
DSP Circulating NA Kit

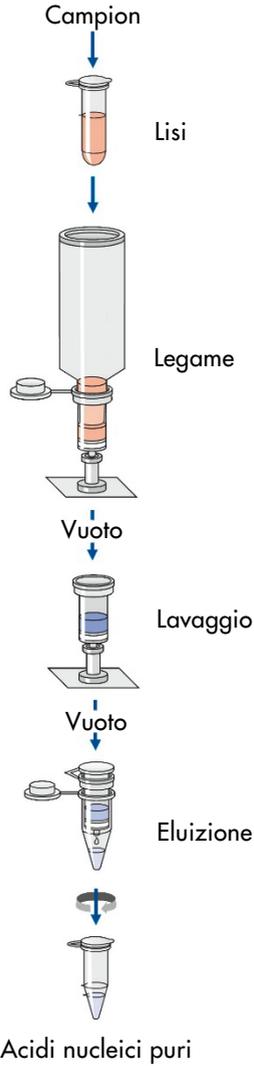


Figura 1. Panoramica della procedura del QIAamp DSP Circulating NA Kit

Lisi di campioni

Gli acidi nucleici liberi circolanti nei fluidi biologici sono solitamente legati a proteine o avvolti in vescicole, e richiedono pertanto una fase di lisi efficace per rilasciare acidi nucleici per il legame selettivo alla colonna QIAamp Mini. Pertanto, i campioni vengono lisati in condizioni altamente denaturanti a temperature elevate, in presenza di proteinasi K e Buffer ACL, che assicurano l'inattivazione delle DNasi e delle RNasi e il rilascio di acidi nucleici da vescicole e proteine e lipidi legati.

Adsorbimento alla membrana della colonna QIAamp Mini

Per consentire il legame ottimale degli acidi nucleici circolanti alla membrana, le condizioni di legame sono regolate mediante l'aggiunta di Buffer ACB al lisato. Successivamente si trasferiscono i lisati a una colonna QIAamp Mini e gli acidi nucleici circolanti vengono adsorbiti da un grande volume sulla membrana di silice, per effetto della pressione indotta dal vuoto. Il sale e le condizioni del pH garantiscono che la maggior parte delle proteine e gli altri contaminanti, che possono inibire la PCR e altre reazioni enzimatiche a valle, non siano trattenuti dalla membrana della colonna QIAamp Mini.

Per il protocollo sono richiesti un collettore da vuoto (ad esempio, il QIAvac 24 Plus con QIAvac Connecting System) e una pompa da vuoto in grado di produrre un vuoto di ~800–900 mbar (ad esempio, QIAGEN® Vacuum Pump). Per un facile monitoraggio della pressione indotta dal vuoto e un comodo rilascio del vuoto si deve utilizzare un Vacuum Regulator (componente del QIAvac Connecting System).

Rimozione di contaminanti residui

Gli acidi nucleici restano legati alla membrana, mentre i contaminanti vengono dilavati efficacemente durante le 3 fasi di lavaggio.

Eluizione di acidi nucleici puri

L'eluizione viene eseguita con Buffer AVE. Gli acidi nucleici circolanti altamente puri vengono eluiti in una singola fase nel Buffer AVE, equilibrato a temperatura ambiente. Si può applicare un volume di eluizione flessibile di 50–150 µl. Se sono necessarie concentrazioni di acido nucleico più elevate, il volume di eluizione può essere ridotto fino a 20 µl. Volumi di eluizione inferiori a 50 µl portano a una maggiore concentrazione di eluiti dell'acido nucleico, ma possono portare a una minore resa totale.

Il volume di eluito recuperato può essere inferiore fino a 5 µl rispetto al volume del tampone di eluizione applicato alla colonna.

Resa e dimensione degli acidi nucleici

Le rese degli acidi nucleici liberi circolanti isolati da campioni biologici sono normalmente inferiori a 1 µg e sono quindi difficili da determinare con uno spettrofotometro. La resa assoluta di DNA e RNA circolanti ottenuti da un campione utilizzando il QIAamp DSP Circulating NA Kit varia tra campioni di individui diversi e dipende anche da altri fattori (ad esempio, alcuni stati di malattia). Inoltre, l'RNA trasportatore presente negli acidi nucleici estratti può dominare le letture dell'assorbanza UV (vedere pagina 25). Per determinare la resa si raccomandano metodi di amplificazione quantitativa.

La distribuzione dimensionale degli acidi nucleici circolanti purificati con il QIAamp DSP Circulating NA Kit può essere controllata mediante elettroforesi su gel di agarosio o ibridazione con una sonda opportunamente marcata per il target⁵ o una soluzione di elettroforesi microfluidica (ad esempio, Agilent Bioanalyzer).

Descrizione dei protocolli

Il presente manuale contiene due diversi protocolli.

Il "Breeze Protocol: purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano" (pagina 27) è destinato all'elaborazione di fino a 5 ml di plasma, 1 ml alla volta, ed è stato ottimizzato per tempistiche ridotte di passaggi manuali e rimessa in esercizio.

Il "Classic Protocol: Purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano" (pagina 32) è destinato all'elaborazione di fino a 5 ml di plasma, 1 ml alla volta, e costituisce il protocollo invariato del Manuale QIAamp DSP Circulating NA Kit Revisione 3 (R3).

Materiali in dotazione

Contenuto del kit

QIAamp DSP Circulating NA Kit			(50)
N. catalogo			61504
Numero preparazioni			50
QIAamp Mini	QIAamp Mini columns with Wash Tubes (Colonne QIAamp Mini con provette di lavaggio) (WT) (2 ml)	COL	50
EXT	Column Extenders (Tubi di estensione) (20 ml)	COL EXT	2 x 25
WT	Wash Tubes (Provette di lavaggio) (2 ml)	WASH TUBE	50
ET	Elution Tubes (Provette di eluizione) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
VC	VacConnectors (Connettori per vuoto)	VAC CON	50
ACL*	Lysis Buffer* (Tampone di lisi)	LYS BUF	220 ml
ACB*	Binding Buffer* (Tampone di legame (concentrato))	BIND BUF CONC	300 ml
ACW1*	Wash Buffer 1* (Tampone di lavaggio) 1 (concentrato)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
ACW2†	Wash Buffer 2† (Tampone di lavaggio) 2 (concentrato)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
AVE†	Elution Buffer† (Tampone di eluizione) (tappi viola)	ELU BUF	5 x 2 ml
PROTK	QIAGEN Proteinase K (proteinasi K QIAGEN)	PROTK	4 x 7 ml
Carrier	Carrier RNA (RNA trasportatore) (tappi rossi)	CAR RNA	310 µg
	Manuale	HB	1

* Contiene un sale caotropico. Per Avvertenze e precauzioni, vedere pagina 12.

† Contiene sodio azide come conservante.

Materiali necessari ma non in dotazione

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le schede di dati di sicurezza (safety data sheets, SDS) disponibili presso il fornitore.

Assicurarsi che gli strumenti siano stati revisionati e calibrati secondo le raccomandazioni del produttore.

Per tutti i protocolli

- Pipette (regolabili)
- Puntali per pipette sterili (si raccomandano puntali per pipette con filtro per aerosol per prevenire la contaminazione crociata)
- Bagnomaria o blocco riscaldante, in grado di mantenere a 56°C o 60°C le provette per centrifuga da 50 ml*
- Blocco riscaldante o simile a 56°C, in grado di mantenere provette di lavaggio da 2 ml (solo per il protocollo classico)*
- Microcentrifuga (con rotore per provette da 2 ml)*
- Provette per centrifuga da 50 ml
- QIAvac 24 Plus vacuum manifold (n. cat. 19413)
- QIAvac Connecting System (n. cat. 19419) o equivalente
- Vacuum Pump (n. cat. 84010 [USA e Canada], 84000 [Giappone] o 84020 [resto del mondo]) o una pompa equivalente in grado di produrre un vuoto da -800 a -900 mbar
- Etanolo (96–100%)[†]
- Isopropanolo (100%)
- Ghiaccio tritato (solo per il "Classic Protocol: Purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano".)
- Alcuni campioni possono richiedere una diluizione con soluzione fisiologica con tampone fosfato (PBS)
- Facoltativo: VacValves (n. cat. 19408)

* Assicurarsi che gli strumenti siano stati controllati e calibrati nel rispetto delle istruzioni del produttore.

[†] Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK).

Avvertenze e precauzioni

Per uso diagnostico in vitro

Durante la manipolazione di sostanze chimiche, è opportuno indossare sempre un camice da laboratorio, guanti monouso e occhiali protettivi. Per maggiori informazioni, consultare le corrispondenti schede tecniche di sicurezza (Safety Data Sheet, SDS). Le schede sono disponibili online nel formato PDF, pratico e compatto, sul sito www.qiagen.com/safety, dove è possibile cercare, visualizzare e stampare la scheda SDS di ogni kit e di ogni componente del kit QIAGEN.

AVVERTENZA Rischio di lesioni personali



NON aggiungere candeggina o soluzioni acide direttamente alle sostanze di scarto della preparazione dei campioni.

Buffer ACL, Buffer ACB e Buffer ACW1 contengono sali di guanidina, che possono formare composti altamente reattivi in combinazione con la candeggina.

Se si rovescia il liquido di questi tamponi, pulire con acqua e detergente da laboratorio idoneo. Se il liquido rovesciato contiene agenti potenzialmente infetti, pulire l'area interessata, prima con acqua e detergente da laboratorio, e successivamente con una soluzione di ipoclorito di sodio all'1% (v/v).

Al componenti del QIAamp DSP Circulating NA Kit sono associate le seguenti informazioni su rischi e misure precauzionali.

Buffer ACB



Contiene guanidina tiocianato. Pericolo! Nocivo se ingerito. Può essere nocivo in caso di contatto con la pelle o se inalato. Provoca gravi ustioni alla pelle e lesioni oculari. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Buffer ACL



Contiene guanidina tiocianato. Pericolo! Nocivo se ingerito. Può essere nocivo in caso di contatto con la pelle o se inalato. Provoca gravi ustioni alla pelle e lesioni oculari. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata. A contatto con acidi libera gas molto tossico. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. **IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI:** sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. Contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico.

Buffer ACW1



Contiene guanidina cloridrato. Avvertenza! Nocivo se ingerito o inalato. Causa irritazione cutanea. Causa grave irritazione agli occhi. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

Proteinasi K



Contiene: Proteinasi K. Pericolo! Causa lieve irritazione cutanea. Se inalato, può causare sintomi di asma e allergia o difficoltà respiratorie. Evitare di respirare le polveri/i fumi/i gas/il prodotto nebulizzato/i vapori/gli aerosol. Indossare guanti/Indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso. Indossare una protezione per la respirazione. IN CASO di esposizione o di possibile esposizione: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico. Portare la persona all'aria aperta e mantenerla tranquilla in posizione confortevole per la respirazione.

Conservazione e manipolazione dei reagenti

Le colonne QIAamp Mini devono essere conservate all'asciutto a temperature comprese tra 2°C e 8°C. Tutti i tamponi devono essere conservati a temperatura ambiente (15–25°C). Le colonne QIAamp Mini e i tamponi si possono conservare in queste condizioni fino alla data di scadenza indicata sulla scatola del kit, senza mostrare alcuna riduzione delle prestazioni.

L'RNA trasportatore liofilizzato deve essere conservato a temperatura ambiente (15–25°C) fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del componente. L'RNA trasportatore deve essere disciolto in Buffer AVE; l'RNA trasportatore disciolto deve essere immediatamente aggiunto al Buffer ACL come descritto a pagina 28 per il Breeze Protocol e a pagina 33 per il Classic Protocol. Questa soluzione deve essere preparata al momento e rimane stabile max. 48 ore se conservata a 2–8°C. Le porzioni inutilizzate di RNA disciolto nel Buffer AVE devono essere congelate in aliquote a temperature comprese tra -30°C e -15°C.

Il QIAamp DSP Circulating NA Kit contiene una soluzione di proteinasi K pronta all'uso, disciolta in un tampone di conservazione appositamente formulato. La proteinasi K è stabile fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta del componente, se conservata a temperatura ambiente (15–25°C).

Conservazione e manipolazione dei campioni

Conservazione e manipolazione del sangue

Per evitare la degradazione degli acidi nucleici liberi e il rilascio di acidi nucleici cellulari, si consiglia di conservare il sangue intero per un massimo di 6 ore a 2–8°C (ad es. campioni EDTA). Se si utilizzano provette di raccolta di sangue stabilizzato, considerare le condizioni di conservazione fornite dal produttore. Si consiglia di convalidare queste condizioni di conservazione in combinazione con la propria applicazione a valle e il proprio target specifici.

Conservazione e manipolazione del plasma

Si raccomanda di eseguire la separazione del plasma e l'isolamento dell'acido nucleico immediatamente dopo la donazione del sangue, quando si utilizza EDTA come anticoagulante, specialmente per l'RNA. Per la conservazione a breve termine, il plasma può essere conservato fino a 24 ore a 2-8°C.

Per una conservazione più prolungata, le aliquote di plasma da provette di raccolta di sangue stabilizzato e non stabilizzato possono essere conservate a -20°C (solo per il DNA come target) o -80°C (DNA e RNA come target) per almeno 4 settimane.

Conservazione di acidi nucleici eluiti

Gli acidi nucleici eluiti vengono raccolti in provette di eluizione da 1,5 ml (in dotazione). Gli acidi nucleici circolanti purificati possono essere conservati fino a 24 ore a 2-8°C. Per periodi di conservazione superiori alle 24 ore, si consiglia di conservare a temperature comprese tra -30 e -15°C per le applicazioni a valle del DNA e da -90 a -60°C per le applicazioni a valle dell'RNA.

Procedura

Punti importanti prima di iniziare

Il QIAvac 24 Plus

Il QIAvac 24 Plus è progettato per un'elaborazione sottovuoto rapida ed efficace, fino a un massimo di 24 colonne spin QIAGEN in parallelo. I campioni e le soluzioni di lavaggio vengono aspirati attraverso le membrane delle colonne sottovuoto anziché per centrifugazione, garantendo una maggiore velocità e tempi di maneggiamento ridotti nelle procedure di purificazione.

In combinazione con il QIAvac Connecting System, il QIAvac 24 Plus può essere utilizzato come sistema a flusso continuo. Il flusso del campione viene raccolto in un flacone di scarico separato.

Per la manutenzione del QIAvac 24 Plus, fare riferimento alle linee guida nel *Manuale QIAvac 24 Plus*.

Elaborazione delle colonne QIAamp Mini sul QIAvac 24 Plus

Le colonne QIAamp Mini sono elaborate sul QIAvac 24 Plus mediante VacConnectors monouso e VacValves riutilizzabili. Le VacValves (facoltative) sono inserite direttamente negli slot luer del collettore QIAvac 24 Plus e garantiscono una portata costante, facilitando l'elaborazione parallela di diversi volumi di campione. Si devono utilizzare se le portate del campione differiscono significativamente, per garantire un vuoto costante. I VacConnectors sono connettori monouso che si inseriscono tra le colonne QIAamp Mini e le VacValves o tra le colonne QIAamp Mini e gli slot luer del QIAvac 24 Plus. Impediscono il contatto diretto tra la colonna spin e la VacValve durante la purificazione, evitando così qualsiasi contaminazione crociata tra i campioni. I VacConnectors si gettano dopo un unico utilizzo. A causa dei grandi volumi di soluzione utilizzati, è richiesto il QIAvac Connecting System (o una configurazione simile con flaconi di scarto) (vedere Figura 2).

Linee guida per l'uso del QIAvac 24 Plus

- Posizionare sempre il QIAvac 24 Plus su un piano o un'area di lavoro sicuri. In caso di caduta, il collettore QIAvac 24 Plus potrebbe rompersi.
- Conservare sempre il QIAvac 24 Plus pulito e asciutto. Per le procedure di pulizia, vedere il Manuale QIAvac 24 Plus.
- I componenti di QIAvac 24 Plus non sono resistenti ad alcuni solventi (Tabella 1). In caso di fuoriuscita di questi solventi sull'unità, sciacquare abbondantemente con acqua.
- Per garantire prestazioni costanti, non applicare grasso di silicone o per tenuta ermetica su nessuna parte del collettore QIAvac 24 Plus.
- Usare sempre cautela e indossare occhiali di sicurezza quando si lavora in prossimità di un collettore da vuoto sotto pressione.
- Contattare il supporto tecnico QIAGEN o il distributore locale per informazioni sui pezzi di scorta o di ricambio.
- La pressione indotta dal vuoto è la pressione differenziale tra l'interno del collettore da vuoto e l'atmosfera (pressione atmosferica standard 1013 millibar o 760 mm Hg) e può essere misurata utilizzando il QIAvac Connecting System (vedere Figura 2). I protocolli richiedono una pompa da vuoto in grado di produrre un vuoto da -800 a -900 mbar (ad es., QIAGEN Vacuum Pump). Evitare pressioni indotte da vuoto più elevate. L'uso di pressioni indotte da vuoto inferiori a quelle raccomandate può ridurre la resa e la purezza dell'acido nucleico e aumentare il rischio di intasamento delle membrane.



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

Tabella 1. Proprietà di resistenza chimica di QIAvac 24 Plus

Resistente a		Non resistente a
Acido acetico	Sali caotropici	Benzene
Acido cromico	Alcool concentrati	Fenolo
SDS	Cloruro di sodio	Cloroformio
Tween® 20	Urea	Toluene
Candeggina	Acido cloridrico	Eteri
Iodossido di sodio		

Impostazione del QIAvac 24 Plus vacuum manifold

1. Collegare il QIAvac 24 Plus a una fonte di vuoto. Se si utilizza il QIAvac Connecting System, collegare il sistema al collettore e alla fonte di vuoto come descritto nell'Appendice A del *Manuale QIAvac 24 Plus*.
2. Inserire una VacValve (facoltativa) nello slot luer del QIAvac 24 Plus da usare (vedere Figura 3). Chiudere gli slot luer non utilizzati con i tappi luer o chiudere la VacValve inserita.
Si devono utilizzare le VacValves se le portate dei campioni differiscono significativamente per garantire un vuoto costante.
3. Inserire un VacConnector in ciascuna VacValve (vedere Figura 3).
Eseguire questo passaggio subito prima di iniziare la purificazione per evitare l'esposizione dei VacConnectors a potenziali contaminanti nell'aria.
4. Posizionare le colonne QIAamp Mini nei VacConnectors sul collettore (vedere Figura 3).
Nota: conservare la provetta di lavaggio della confezione blister per l'uso nel protocollo di purificazione.
5. Inserire un tubo di estensione (20 ml) in ogni colonna QIAamp Mini (vedere Figura 3).
Nota: assicurarsi che il tubo di estensione sia saldamente inserito nella colonna QIAamp Mini per evitare perdite di campione.

6. Per la purificazione dell'acido nucleico, seguire le istruzioni dei protocolli. Dopo l'uso, gettare adeguatamente i VacConnectors.

Lasciare aperto il coperchio della colonna QIAamp Mini mentre si applica il vuoto.

Disattivare il vuoto tra un passaggio e l'altro per garantire che durante l'elaborazione venga applicato un vuoto uniforme e costante. Per un più rapido rilascio del vuoto, è necessario utilizzare un Vacuum Regulator (parte del QIAvac Connecting System).

Nota: ogni VacValve può essere chiusa singolarmente quando il campione è completamente estratto attraverso la colonna spin, consentendo l'elaborazione parallela di campioni con volumi o viscosità differenti.

7. Dopo l'elaborazione dei campioni, pulire il QIAvac 24 Plus (vedere "Pulizia e Disinfezione del QIAvac 24 Plus" nel *Manuale QIAvac 24 Plus*).

Nota: i Buffer ACL, ACB e ACW1 non sono compatibili con agenti disinfettanti contenenti candeggina. Per Avvertenze e precauzioni, vedere pagina 12.

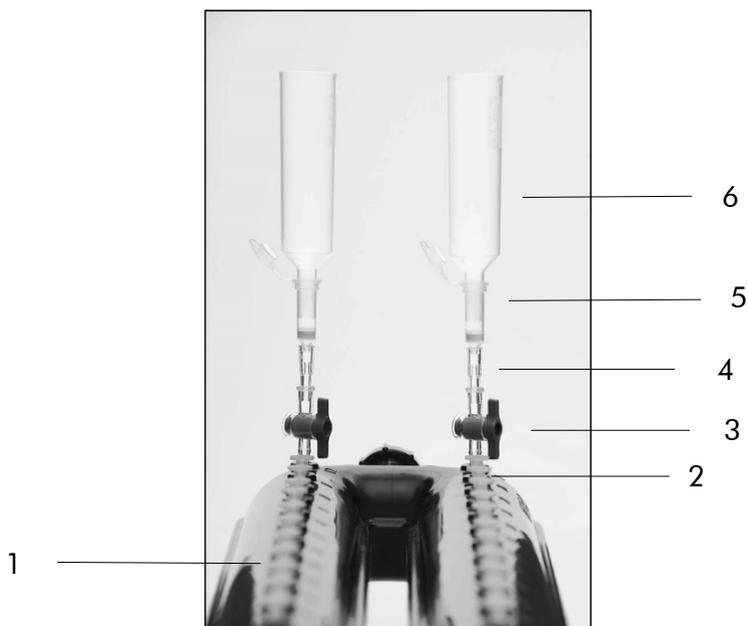
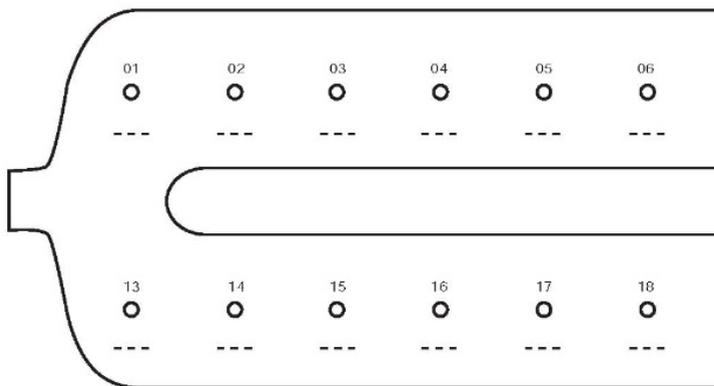


Figura 3. Installazione del QIAvac 24 Plus con colonne QIAamp Mini utilizzando VacValves, VacConnectors e tubi di estensione.

- | | |
|---|-----------------------|
| 1 QIAvac 24 Plus vacuum manifold | 4 VacConnector |
| 2 Slot luer del QIAvac 24 Plus
(chiuso con tappo luer) | 5 Colonna QIAamp Mini |
| 3 VacValve** | 6 Tubo di estensione |

Si consiglia di etichettare le provette e le colonne QIAamp Mini per l'impiego sul collettore da vuoto QIAvac 24 Plus secondo lo schema in Figura 4, in modo da non confondere i campioni. Per praticità, è possibile fotocopiare la figura e apporvi le etichette dei nomi dei campioni.

* Da acquistare separatamente.



Data: _____

Operatore: _____

ID esecuzione: _____

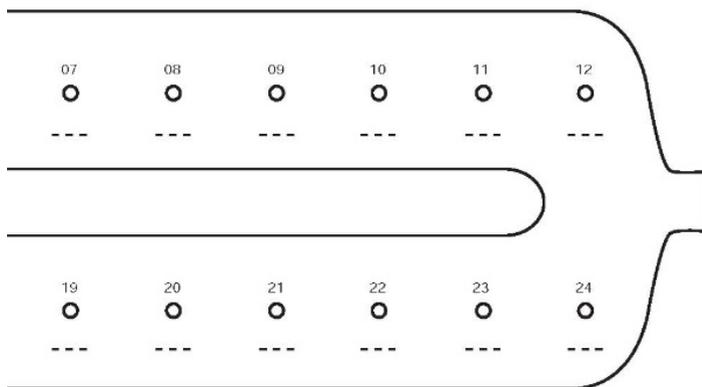


Figura 4. Schema di etichettatura per provette e colonne QIAamp Mini da utilizzare sull'apparato da vuoto QIAvac 24 Plus

Preparazione di tamponi e reagenti

Buffer ACB

Prima dell'uso, aggiungere 200 ml di isopropanolo (100%) a 300 ml di Buffer ACB concentrato per ottenere 500 ml di Buffer ACB. Miscelare bene dopo l'aggiunta di isopropanolo.

Buffer ACW1 *

Prima dell'uso, aggiungere 25 ml di etanolo (96–100%) a 19 ml di Buffer ACW1 concentrato per ottenere 44 ml di Buffer ACW1. Miscelare bene dopo aver aggiunto etanolo.

Buffer ACW2†

Prima dell'uso, aggiungere 30 ml di etanolo (96–100%) a 13 ml di Buffer ACW2 concentrato per ottenere 43 ml di Buffer ACW2. Miscelare bene dopo aver aggiunto etanolo.

Aggiunta di RNA trasportatore a Buffer ACL*

L'RNA trasportatore svolge una duplice funzione: in primo luogo potenzia il legame degli acidi nucleici sulla membrana della QIAamp Mini, soprattutto se il campione contiene un numero molto limitato di molecole target. In secondo luogo, aggiungendo grandi quantità di RNA trasportatore si riduce la possibilità di degradazione dell'RNA, nel raro caso che le molecole delle RNasi non vengano denaturate dai sali caotropici e dai detergenti nel Buffer ACL.

La quantità di RNA trasportatore liofilizzato in dotazione è sufficiente per il volume di Buffer ACL in dotazione con il kit. La concentrazione dell'RNA trasportatore raccomandata è stata regolata in modo tale che il protocollo del QIAamp DSP Circulating NA possa essere utilizzato come sistema

* Contiene sale caotropico. Vedere pagina 12 per le avvertenze e le precauzioni.

† Contiene sodio azide come conservante.

di purificazione generico, compatibile con molti diversi sistemi di amplificazione, e sia adatto a una vasta gamma di DNA e RNA target.

I diversi sistemi di amplificazione variano in termini di efficienza in funzione della quantità totale degli acidi nucleici presenti nella reazione. Gli eluiti di questo kit contengono sia acidi nucleici circolanti che RNA trasportatore, e il quantitativo di RNA trasportatore supera di gran lunga quello degli acidi nucleici circolanti nella maggior parte dei casi. Pertanto, la quantificazione degli acidi nucleici circolanti isolati mediante lettura di assorbanza UV non sarà adeguata, in quanto i risultati di tali misurazioni sono determinati dalla presenza di RNA trasportatore.

Per ottenere il massimo livello di sensibilità nelle reazioni di amplificazione, potrebbe rendersi necessario ridurre la quantità di RNA trasportatore aggiunta al Buffer ACL.

Per i sistemi di amplificazione con primer oligo dT, durante l'isolamento degli acidi nucleici liberi circolanti non si deve aggiungere RNA trasportatore.

Aggiungere 1550 µl di Buffer AVE * alla provetta contenente 310 µg di RNA trasportatore liofilizzato, ottenendo quindi una soluzione con concentrazione di 0,2 µg/µl. Disciogliere completamente il carrier RNA, suddividerlo in aliquote di dimensioni opportune e conservarlo a una temperatura compresa tra -30 e -15°C. Non congelare e scongelare le aliquote di RNA trasportatore più di 3 volte.

Notare che l'RNA trasportatore non si discioglie nel Buffer ACL. Prima è necessario discioglierlo nel Buffer AVE e successivamente aggiungerlo al Buffer ACL.

*Contiene sodio azide come conservante.

Calcolare il volume della miscela di Buffer ACL e RNA trasportatore necessaria per un lotto di campioni secondo le tabelle dei protocolli. Selezionare il numero di campioni da elaborare simultaneamente.

Miscelare delicatamente la provetta o il flacone capovolgendoli 10 volte. Per evitare la formazione di schiuma, non utilizzare il vortex.

Nota: la procedura di preparazione dei campioni è ottimizzata per 1,0 µg di RNA trasportatore per campione. Se una minore quantità di RNA trasportatore dimostra di essere più indicata per un determinato sistema di amplificazione, trasferire solo la quantità necessaria di RNA trasportatore disciolta nelle provette contenenti Buffer ACL. Per ogni microgrammo di RNA trasportatore necessario per ogni preparazione, aggiungere 5 µl di RNA trasportatore disciolto in Buffer ACL (l'uso di meno di 1,0 µg di RNA trasportatore per campione può essere vantaggioso e deve essere convalidato per ogni particolare tipo di campione e di esame a valle).

Breeze Protocol: purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano

Questo protocollo è destinato alla purificazione del DNA e dell'RNA circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano ed è stato ottimizzato per tempistiche ridotte di passaggi manuali e rimessa in esercizio. Per i flussi di lavoro esistenti e convalidati dall'utente con il QIAamp DSP Circulating Kit versione 1/R3, fare riferimento al "Classic Protocol: Purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano" (pagina 32).

Punti importanti prima di iniziare

- Tutte le fasi di centrifugazione hanno luogo a temperatura ambiente (15–25°C).
- Disattivare il vuoto tra una fase e l'altra, per garantire che durante le fasi del protocollo venga applicato un vuoto uniforme e costante.
- Nota: la pressione della pompa per il vuoto deve essere compresa tra -800 e -900 mbar.
- Termostatare i campioni a temperatura ambiente.
- Utilizzare una soluzione fisiologica con tampone fosfato per portare il volume del campione più possibile al volume esatto (da 1 ml a 5 ml).
- Impostare il QIAvac 24 Plus come descritto a pagina 19.
- Riscaldare un bagno d'acqua o un blocco riscaldante a 56°C per l'uso con provette da centrifuga da 50 ml nella fase 3.
- Prima dell'uso, termostatare le colonne QIAamp Mini Spin per almeno 1 ora a temperatura ambiente.
- Accertarsi che Buffer ACB, Buffer ACW1 e Buffer ACW2 siano stati preparati (aggiunta di isopropanolo o etanolo) secondo le istruzioni di pagina 24.
- Aggiungere al Buffer ACL l'RNA trasportatore ricostituito nel Buffer AVE, seguendo le istruzioni della Tabella 2.

Tabella 2. Volume di Buffer ACL e RNA trasportatore (disciolto in Buffer AVE) necessario per l'elaborazione di campioni di plasma umano da 1-5 ml

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

Procedura: Breeze Protocol

1. Pipettare QIAGEN Proteinase K, plasma e Buffer ACL in questo ordine in una provetta da centrifuga da 50 ml (non in dotazione).

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

2. Chiudere il tappo e miscelare con vortex a pulsazione per 5 volte x 2 secondi.

Assicurarsi che nella provetta si formi un vortice visibile. Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il Buffer ACL, in modo da ottenere una soluzione omogenea.

Nota: non interrompere la procedura in questa fase. Procedere immediatamente alla fase 3 per avviare l'incubazione della lisi.

3. Incubare a 56°C (±1°C) per 15 (±1) minuti.
4. Rimettere la provetta sul banco del laboratorio e svitare il tappo.
5. Aggiungere il Buffer ACB al lisato nella provetta. Scegliere il volume in base all'impostazione della fase 1.

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

6. Chiudere il tappo e miscelare scrupolosamente con vortex a pulsazione per 5 x 2 secondi.

Assicurarsi che nella provetta si formi un vortice visibile. Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il lisato e il Buffer ACB, in modo da ottenere una soluzione omogenea.

7. Incubare la miscela lisato-Buffer ACB nella provetta per 5 (\pm 1) minuti a temperatura ambiente.

8. Inserire la colonna QIAamp Mini nel VacConnector sul QIAvac 24 Plus (vedere Impostazione del QIAvac 24 Plus vacuum manifold a pagina 19). Inserire un tubo di estensione da 20 ml nella colonna QIAamp Mini aperta.

Assicurarsi che il tubo di estensione sia saldamente inserito nella colonna QIAamp Mini per evitare perdite di campione.

Nota: mettere da parte la provetta di lavaggio per la centrifugazione, da effettuare nella fase 13.

9. Applicare con cautela il lisato proveniente dalla fase 7 nel tubo di estensione della colonna QIAamp Mini. Azionare la pompa da vuoto. Quando tutti i lisati sono stati aspirati completamente attraverso le colonne, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar. Rimuovere con attenzione ed eliminare il tubo di estensione.

Si noti che il passaggio di grandi volumi di lisato di campione (circa 18 ml quando si inizia con un campione di 5 ml) attraverso la membrana QIAamp Mini con la forza del vuoto può richiedere fino a 20 minuti.

Per un rapido e comodo rilascio della pressione indotta da vuoto, è necessario utilizzare un Vacuum Regulator (parte del QIAvac Connecting System).

Nota: per evitare la contaminazione crociata, fare attenzione a non scambiare le colonne QIAamp Mini vicine mentre si rimuovono i tubi di estensione.

10. Applicare 600 μ l di Buffer ACW1 alla colonna QIAamp Mini. Lasciare aperto il tappo della colonna e azionare la pompa da vuoto. Dopo che tutto il Buffer ACW1 è stato prelevato attraverso la colonna QIAamp Mini, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar.

11. Applicare 750 μ l di Buffer ACW2 alla colonna QIAamp Mini. Lasciare aperto il tappo della colonna e azionare la pompa da vuoto. Dopo che tutto il Buffer ACW2 è stato prelevato attraverso la colonna QIAamp Mini, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar.

12. Applicare 750 µl di etanolo (96–100%) alla colonna QIAamp Mini. Lasciare aperto il tappo della colonna e azionare la pompa da vuoto. Dopo che tutto l'etanolo è stato prelevato attraverso la colonna spin, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar.
13. Chiudere il tappo della colonna QIAamp Mini. Togliere quest'ultima dal collettore da vuoto e gettare il VacConnector. Posizionare la colonna QIAamp Mini in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml (dalla fase 8) e centrifugare a piena velocità (20.000 x g; 14.000 rpm) per 3 (±0,5) minuti.
14. Inserire la colonna QIAamp Mini in una nuova provetta di lavaggio da 2 ml. Aprire il tappo e incubare il gruppo a temperatura ambiente per 3 minuti per asciugare completamente la membrana.
15. Inserire la colonna QIAamp Mini in una provetta di eluizione pulita da 1,5 ml (in dotazione) e gettare la provetta di lavaggio da 2 ml della fase 14. Applicare con cautela 20–150 µl di Buffer AVE al centro della membrana della colonna QIAamp Mini. Chiudere il tappo e incubare a temperatura ambiente per 3 minuti (±0,5).

Importante: accertarsi che il Buffer AVE di eluizione sia termostato a temperatura ambiente (15–25°C). Se si esegue l'eluizione su piccoli volumi (<50 µl), il tampone di eluizione deve essere dispensato sul centro della membrana per l'eluizione completa degli acidi nucleici legati.

Il volume di eluizione è flessibile e può essere adattato alle esigenze delle applicazioni a valle.

Un'eluizione con volumi inferiori di Buffer AVE porta a maggiori concentrazioni di acido nucleico, ma può tradursi in una minore resa totale.

Il volume di eluito recuperato può essere fino a 5 µl in meno del volume di eluizione applicato alla membrana della colonna QIAamp Mini.

Nota: qualora si presuppongano basse rese di acido nucleico, si raccomanda l'uso di una provetta di eluizione low-bind (non in dotazione).

16. Centrifugare in una microcentrifuga alla velocità massima (circa 20.000 x g; 14.000 rpm) per 1 minuto, in modo da eluire gli acidi nucleici.

Classic Protocol: Purificazione degli acidi nucleici circolanti da 1–5 ml di plasma di sangue umano

Questo protocollo costituisce il protocollo immutato del Manuale QIAamp DSP Circulating NA Kit Revisione 3 (R3) per l'uso con, ad esempio, flussi di lavoro convalidati dall'utente esistenti per 1-5 ml di plasma umano.

Punti importanti prima di iniziare

- Tutte le fasi di centrifugazione hanno luogo a temperatura ambiente (15–25°C).
- Disattivare il vuoto tra una fase e l'altra, per garantire che durante le fasi del protocollo venga applicato un vuoto uniforme e costante.
Nota: la pressione della pompa per il vuoto deve essere compresa tra -800 e -900 mbar.
- Termostatare i campioni a temperatura ambiente.
- Utilizzare una soluzione fisiologica con tampone fosfato per portare il volume del campione più possibile al volume esatto (da 1 ml a 5 ml).
- Impostare il QIAvac 24 Plus come descritto a pagina 19.
- Riscaldare un bagno d'acqua o un blocco riscaldante a 60°C per l'uso con provette da centrifuga da 50 ml nella fase 3.
- Riscaldare un blocco riscaldante a 56°C per l'uso con provette di lavaggio da 2 ml nella fase 14.
- Prima dell'uso, termostatare le colonne QIAamp Mini Spin per almeno 1 ora a temperatura ambiente.
- Accertarsi che Buffer ACB, Buffer ACW1 e Buffer ACW2 siano stati preparati (aggiunta di isopropanolo o etanolo) secondo le istruzioni di pagina 24.
- Aggiungere al Buffer ACL l'RNA trasportatore ricostituito nel Buffer AVE, seguendo le istruzioni della Tabella 3.

Tabella 3. Volume di Buffer ACL e RNA trasportatore (disciolto in Buffer AVE) necessario per l'elaborazione di campioni di plasma umano da 1-5 ml

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

Procedura: Classic Protocol

1. Pipettare QIAGEN Proteinase K, plasma e Buffer ACL in questo ordine in una provetta da centrifuga da 50 ml (non in dotazione).

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

2. Chiudere il tappo e miscelare con vortex a pulsazione per 30 secondi.

Assicurarsi che nella provetta si formi un vortice visibile. Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il campione e il Buffer ACL, in modo da ottenere una soluzione omogenea.

Nota: non interrompere la procedura in questa fase. Procedere immediatamente alla fase 3 per avviare l'incubazione della lisi.

3. Incubare a 60°C (± 1°C) per 30 (± 2) minuti.
4. Rimettere la provetta sul banco del laboratorio e svitare il tappo.
5. Aggiungere il Buffer ACB al lisato nella provetta. Scegliere il volume in base all'impostazione della fase 1.

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

6. Chiudere il tappo e miscelare scrupolosamente con vortex a pulsazione per 30 secondi.

Assicurarsi che nella provetta si formi un vortice visibile. Per assicurare una lisi efficace, è essenziale miscelare con cura il lisato e il Buffer ACB, in modo da ottenere una soluzione omogenea.

7. Incubare la miscela lisato-Buffer ACB nella provetta per 5 (\pm 1) minuti su ghiaccio.

8. Inserire la colonna QIAamp Mini nel VacConnector sul QIAvac 24 Plus (vedere Impostazione del QIAvac 24 Plus vacuum manifold a pagina 19). Inserire un tubo di estensione da 20 ml nella colonna QIAamp Mini aperta.

Assicurarsi che il tubo di estensione sia saldamente inserito nella colonna QIAamp Mini per evitare perdite di campione.

Nota: mettere da parte la provetta di lavaggio per la centrifugazione, da effettuare nella fase 13.

9. Applicare con cautela il lisato proveniente dalla fase 7 nel tubo di estensione della colonna QIAamp Mini. Azionare la pompa da vuoto applicando una pressione compresa tra -800 e -900 mbar. Quando tutti i lisati sono stati aspirati completamente attraverso le colonne, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar. Rimuovere con attenzione ed eliminare il tubo di estensione.

Si noti che il passaggio di grandi volumi di lisato di campione (circa 18 ml quando si inizia con un campione di 5 ml) attraverso la membrana QIAamp Mini con la forza del vuoto può richiedere fino a 20 minuti.

Per un rapido e comodo rilascio della pressione indotta da vuoto, è necessario utilizzare un Vacuum Regulator (parte del QIAvac Connecting System).

Nota: per evitare la contaminazione crociata, fare attenzione a non scambiare le colonne QIAamp Mini vicine mentre si rimuovono i tubi di estensione.

10. Applicare 600 μ l di Buffer ACW1 alla colonna QIAamp Mini. Lasciare aperto il tappo della colonna e azionare la pompa da vuoto. Dopo che tutto il Buffer ACW1 è stato prelevato attraverso la colonna QIAamp Mini, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar.

11. Applicare 750 μ l di Buffer ACW2 alla colonna QIAamp Mini. Lasciare aperto il tappo della colonna e azionare la pompa da vuoto. Dopo che tutto il Buffer ACW2 è stato prelevato attraverso la colonna QIAamp Mini, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar.

12. Applicare 750 µl di etanolo (96–100%) alla colonna QIAamp Mini. Lasciare aperto il tappo della colonna e azionare la pompa da vuoto. Dopo che tutto l'etanolo è stato prelevato attraverso la colonna spin, spegnere la pompa da vuoto e rilasciare la pressione a 0 mbar.
13. Chiudere il tappo della colonna QIAamp Mini. Togliere quest'ultima dal collettore da vuoto e gettare il VacConnector. Posizionare la colonna QIAamp Mini in una provetta di lavaggio pulita da 2 ml (dalla fase 8) e centrifugare a piena velocità (20.000 x g; 14.000 rpm) per 3 (±0,5) minuti.
14. Inserire la colonna QIAamp Mini in una nuova provetta di lavaggio da 2 ml. Aprire il coperchio e incubare il gruppo a 56°C (±1°C) per 10 (±1) minuti per asciugare completamente la membrana.
15. Inserire la colonna QIAamp Mini in una provetta di eluizione pulita da 1,5 ml (in dotazione) e gettare la provetta di lavaggio da 2 ml della fase 13. Applicare con cautela 20–150 µl di Buffer AVE al centro della membrana della colonna QIAamp Mini. Chiudere il tappo e incubare a temperatura ambiente per 3 minuti (±0,5).

Importante: accertarsi che il Buffer AVE di eluizione sia termostato a temperatura ambiente (15–25°C). Se si esegue l'eluizione su piccoli volumi (<50 µl), il tampone di eluizione deve essere dispensato sul centro della membrana per l'eluizione completa degli acidi nucleici legati.

Il volume di eluizione è flessibile e può essere adattato alle esigenze delle applicazioni a valle.

Un'eluizione con volumi inferiori di Buffer AVE porta a maggiori concentrazioni di acido nucleico, ma può tradursi in una minore resa totale.

Il volume di eluito recuperato può essere fino a 5 µl in meno del volume di eluizione applicato alla colonna QIAamp Mini.

Nota: qualora si presuppongano basse rese di acido nucleico, si raccomanda l'uso di una provetta di eluizione low-bind (non in dotazione).

16. Centrifugare in una microcentrifuga alla velocità massima (circa 20.000 x g; 14.000 rpm) per 1 minuto, in modo da eluire gli acidi nucleici.

Controllo di qualità

In conformità con il Sistema di Gestione della Qualità certificato ISO di QIAGEN, ogni lotto di QIAamp DSP Circulating NA Kit è stato testato in base a specifiche predefinite per garantire la costante qualità del prodotto.

Limitazioni

Le prestazioni del sistema per l'isolamento degli acidi nucleici liberi circolanti sono state stabilite utilizzando campioni di plasma umano generati dalle seguenti provette per la raccolta di sangue:

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

È responsabilità dell'utente convalidare le prestazioni del sistema per qualunque procedura utilizzata in laboratorio che non sia stata già oggetto di uno studio di valutazione delle prestazioni da parte di QIAGEN.

Per minimizzare il rischio di un impatto negativo sui risultati diagnostici, è necessario ricorrere ad adeguati controlli delle applicazioni a valle. Per un'ulteriore convalida, si consiglia di attenersi alle linee guida della Conferenza Internazionale sull'Armonizzazione dei Requisiti Tecnici (International Conference on Harmonization of Technical Requirements, ICH) riportate in ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures Text And Methodology (Convalida dei metodi analitici: testo e metodologia).

Eventuali risultati diagnostici generati dal sistema devono essere interpretati in combinazione con gli esiti di altri esami clinici o di laboratorio.

Simboli

Simbolo	Definizione del simbolo
	Contenuto sufficiente per <N> test
	Data di scadenza
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Al momento della consegna
	Aprire alla consegna; conservare le colonne QIAamp Mini Spin a 2-8°C
	Numero di catalogo
	Numero
	Numero di lotto
	Numero di materiale
	Componenti
	Volume
	Aggiunta
	Limite di temperatura



Produttore



Consultare le istruzioni per l'uso



Annotare la data corrente dopo aver aggiunto etanolo al flacone



Etanolo



Annotare la data corrente dopo aver aggiunto isopropanolo al flacone



Isopropanolo



Contiene



Porta a



Guanidina tiocianato



Guanidina cloridrato



BRIJ 58



Codice GTIN

Riferimenti

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

Informazioni di contatto

Per ricevere assistenza tecnica e ulteriori informazioni, potete consultare il nostro sito support.qiagen.com o contattare il servizio di assistenza tecnica QIAGEN o il distributore locale (consultare il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com).

Guida alla risoluzione dei problemi

Questa guida alla risoluzione dei problemi può essere utile per risolvere eventuali situazioni problematiche. Per le informazioni sui contatti, vedere il retro di copertina o visitare il sito www.qiagen.com.

Commenti e suggerimenti

Acido nucleico scarso o assente nell'eluato

- | | | |
|----|--|--|
| a) | Uso di plasma non stabilizzato | I campioni di plasma non stabilizzati possono portare a una degradazione accelerata del DNA. Consigliamo di seguire CEN/TS 16835-3:2015. Ripetere il processo di purificazione con nuovi campioni. |
| b) | Tempo prolungato tra prelievo di sangue e preparazione del plasma | Le cellule ematiche nucleate possono disintegrarsi e rilasciare DNA genomico nel plasma, diluendo l'acido nucleico target. |
| c) | Campioni congelati e scongelati più di una volta | Evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti, in quanto possono portare alla degradazione del DNA. Usare sempre dei campioni freschi oppure dei campioni scongelati una sola volta. |
| d) | Bassa concentrazione di DNA target nei campioni | I campioni di plasma sono stati lasciati a temperatura ambiente per troppo tempo. Ripetere il processo di purificazione con nuovi campioni

Nota: alcuni individui possono avere una bassa concentrazione di acidi nucleici liberi nel plasma; in questo caso, si dovrebbe scegliere un volume di campione maggiore e un volume di eluito basso. |
| e) | Lisi del campione inefficiente in Buffer ACL | Se QIAGEN Proteinase K è stato sottoposto a temperature elevate per un tempo prolungato, può ridurre la sua capacità d'azione. Ripetere la procedura utilizzando nuovi campioni e QIAGEN Proteinase K fresco. |
| f) | Miscela di Buffer ACL-RNA trasportatore non sufficientemente miscelata | Miscelare Buffer ACL con RNA trasportatore capovolgendo delicatamente la provetta di Buffer ACL-RNA trasportatore almeno 10 volte. |
| g) | Bassa percentuale di etanolo utilizzata invece del 96–100% | Ripetere la procedura di purificazione con nuovi campioni e il 96–100% di etanolo. Non utilizzare alcol denaturato, in quanto contiene altre sostanze come il metanolo o il metiletilchetone (MEK). |
| h) | Buffer ACB preparato in modo errato | Controllare che il concentrato di Buffer ACB sia stato ricostituito con il corretto volume di isopropanolo (non etanolo, vedere pagina 24). |
| i) | Buffer ACW1 o Buffer ACW2 preparato in modo errato | Controllare che i concentrati di Buffer ACW1 e Buffer ACW2 siano stati diluiti con il corretto volume di etanolo (vedere pagina 24). Ripetere il processo di purificazione con nuovi campioni. |
| j) | Buffer ACW1 o Buffer ACW2 preparato con il 70% di etanolo | Controllare che i concentrati di Buffer ACW1 e Buffer ACW2 siano stati diluiti con il 96–100% di etanolo (vedere pagina 24). Ripetere il processo di purificazione con nuovi campioni. |

Commenti e suggerimenti

Resa insufficiente del DNA e dell'RNA nelle reazioni enzimatiche a valle

- | | | |
|----|---|--|
| a) | DNA scarso o assente nell'eluato | Vedere sopra "Acido nucleico scarso o assente nell'eluato" per i possibili motivi. Aumentare la quantità di eluito aggiunto alla reazione, se possibile. |
| b) | Volume di eluizione inadeguato utilizzato | Stabilire il massimo volume di eluito adatto per la vostra applicazione a valle. Ridurre o aumentare di conseguenza il volume di eluito aggiunto all'applicazione a valle. Il volume di eluizione può essere adattato in proporzione.

Nota: un'eluizione con volumi inferiori di Buffer AVE porta a maggiori concentrazioni di acido nucleico, ma può tradursi in una minore resa totale. |
| c) | Tamponi non miscelati accuratamente | È possibile che i componenti sale ed etanolo del Buffer ACW2 di lavaggio si siano separati dopo essere rimasti inutilizzati per un lungo periodo tra una seduta e l'altra. Miscelare sempre accuratamente i tamponi prima di ogni seduta. |
| d) | Interferenza dovuta a RNA trasportatore | Se la presenza di RNA trasportatore nell'eluato interferisce con la reazione enzimatica a valle, può essere necessario ridurre la quantità di RNA trasportatore o eliminarlo del tutto. |

Raccomandazioni generali per il trattamento

- | | | |
|----|-------------------------------|--|
| a) | Colonne QIAamp Mini intasate | Se la portata è ridotta, la durata del vuoto può essere prolungata.

In alternativa, chiudere la VacValve, se la si utilizza, e rimuovere con attenzione il gruppo tubo di estensione-VacConnector-VacValve dalla colonna QIAamp Mini senza perdere il lisato nel tubo di estensione.

Rimuovere la colonna QIAamp Mini dal collettore da vuoto, posizionarla in una provetta di lavaggio da 2 ml e ruotarla a piena velocità fino a quando il campione non sia passato completamente attraverso la membrana. Riposizionare il gruppo tubo di estensione-VacConnector-VacValve che contiene il lisato rimanente. Accendere la pompa del vuoto, aprire la VacValve e continuare a caricare il lisato rimanente.

Ripetere la procedura precedente se la colonna QIAamp Mini continua a intasarsi.

Nel plasma si possono essere formati crioprecipitati a causa di ripetuti congelamenti e scongelamenti. Questi possono bloccare la colonna QIAamp Mini. Non utilizzare plasma congelato e scongelato più di una volta.

Nel caso in cui siano visibili crioprecipitati, eliminare il campione mediante centrifugazione per 5 minuti a 16.000 x g. |
| b) | Volumi di eluizione variabili | Campioni diversi possono influenzare il volume dell'eluato finale. Il volume di eluito recuperato può essere fino a 5 µl in meno del volume di eluizione applicato alla colonna QIAamp Mini. |

Commenti e suggerimenti

- c) Pressione di vuoto da -800 a -900 mbar non raggiunta
- Il collettore da vuoto non è chiuso ermeticamente. Premere il coperchio del collettore da vuoto dopo l'attivazione del vuoto. Controllare se è stata raggiunta la pressione del vuoto.
- La guarnizione del coperchio del QIAvac è consumata. Controllare visivamente la tenuta del collettore e sostituirla se necessario.
- Le VacValves si sono consumate. Rimuovere tutte le VacValves e inserire i VacConnector direttamente nelle estensioni luer. Inserire la colonna QIAamp Mini nei VacConnectors, chiudere il tappo delle colonne e azionare il vuoto. Controllare se è stata raggiunta la pressione del vuoto. Sostituire le VacValves, se necessario.
- La connessione alla pompa del vuoto non è a tenuta stagna. Chiudere tutte le estensioni luer con tappi luer e azionare la pompa del vuoto. Controllare se la pressione del vuoto è stabile dopo l'azionamento della pompa (e la valvola del Vacuum Regulator è chiusa). Sostituire le connessioni tra pompa e collettore da vuoto, se necessario.
- Se la pressione del vuoto non viene ancora raggiunta, sostituire la pompa da vuoto con una più forte.

Appendice A: Raccomandazione per la separazione e la conservazione del plasma sanguigno

Per la stabilizzazione delle provette per la raccolta di sangue (ad es. provetta PAXgene ccfDNA o provetta Streck Cell-Free DNA) seguire le istruzioni del produttore per la separazione e la conservazione del plasma. Si consiglia di convalidare queste condizioni di conservazione in combinazione con la propria applicazione a valle e il proprio target specifici.

Per provette di raccolta del sangue non stabilizzato, consigliamo di seguire CEN/TS 16835-3:2015.

Al fine di isolare gli acidi nucleici liberi circolanti dai campioni di sangue, si consiglia di seguire questo protocollo, che prevede una fase di centrifugazione a elevata forza gravitazionale per rimuovere i detriti cellulari, riducendo così la quantità di DNA e RNA cellulare o genomico nel campione.

1. Collocare il sangue intero EDTA in provette BD Vacutainer® (o altre provette primarie contenenti EDTA come anticoagulante) in una centrifuga raffreddata a 4°C con rotore oscillante e scomparti adeguati.
2. Centrifugare i campioni di sangue per 10 minuti a 1900 x g (3000 rpm) a 4°C.
3. Aspirare accuratamente il surnatante con plasma senza alterare lo strato di interfaccia plasma-cellula. Da una provetta primaria da 10 ml si possono ottenere circa 4–5 ml di plasma.

Nota: in questa fase, il plasma può essere utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico circolante. Tuttavia, la successiva centrifugazione ad alta velocità rimuoverà ulteriori detriti cellulari e la contaminazione degli acidi nucleici circolanti con DNA e RNA genomici derivati da cellule ematiche nucleate danneggiate.

-
4. Il plasma aspirato viene trasferito in una nuova provetta da centrifuga.
 5. Centrifugare i campioni di plasma per 10 minuti a 16.000 x g (in rotore ad angolo fisso) a 4°C.

Questo rimuoverà gli ulteriori acidi nucleici cellulari attaccati ai detriti cellulari.

6. Rimuovere accuratamente il surnatante e trasferirlo in una nuova provetta senza toccare il sedimento.
7. Se il plasma sarà utilizzato per l'estrazione dell'acido nucleico quello stesso giorno, conservare a 2-8°C fino all'ulteriore elaborazione. Per una conservazione più prolungata, le aliquote di plasma da provette di raccolta di sangue stabilizzato e non stabilizzato possono essere conservate a -20°C (DNA come target) o -80°C (RNA come target) almeno per 4 settimane. Prima di utilizzare il plasma per l'estrazione dell'acido nucleico circolante, scongelare le provette di plasma a temperatura ambiente.
8. Facoltativo: per rimuovere i crioprecipitati, centrifugare i campioni di plasma per 5 minuti a 16.000 x g (in rotore ad angolo fisso).

Facoltativo: trasferire il surnatante in una nuova provetta, quindi iniziare con il protocollo di estrazione dell'acido nucleico circolante.

Appendice B: Note generali per il trattamento dell'RNA

Trattamento dell'RNA

Le ribonucleasi (RNasi) sono enzimi molto stabili e attivi che non necessitano normalmente di cofattori per espletare la loro funzione. Poiché le RNasi sono difficili da inattivare e anche minime quantità sono sufficienti a distruggere l'RNA, non utilizzare materiale in plastica o vetro senza aver prima eliminato le possibili contaminazioni da RNasi. Fare molta attenzione a non introdurre inavvertitamente RNasi nel campione di RNA durante o dopo la procedura di purificazione. Per creare e mantenere un ambiente privo di RNasi, mentre si lavora con l'RNA adottare le seguenti precauzioni durante il pretrattamento e l'uso di recipienti monouso e riutilizzabili e di soluzioni.

Raccomandazioni generali per il trattamento

Quando si lavora con l'RNA è necessario utilizzare tecniche di asepsi microbiologiche appropriate. Le mani e le particelle di polvere possono essere vettori di batteri e muffe e sono la fonte più comune di contaminazione da RNasi. Indossare sempre guanti in lattice o vinile quando si manipolano i reagenti e i campioni di RNA, per evitare la contaminazione da RNasi dovuta alla superficie della pelle o alla polvere delle attrezzature di laboratorio. Cambiare i guanti frequentemente e chiudere le provette subito dopo l'uso. Mantenere l'RNA purificato in ghiaccio mentre si pipettano le aliquote per le applicazioni successive.

Plastica da laboratorio monouso

Si raccomanda l'uso di provette in polipropilene monouso, prive di RNasi e sterili durante l'intera procedura.

Informazioni per gli ordini

Prodotto	Contenuto	N. di catalogo
QIAamp DSP Circulating NA Kit (50)	Per 50 preparazioni: QIAamp Mini Column, tubi di estensione, VacConnectors, QIAGEN Proteinase K, reagenti, tamponi e provette di raccolta	61504
Accessori		
QIAvac 24 Plus vacuum manifold*	Collettore da vuoto per processare 1–24 colonne spin: QIAvac 24 Plus Vacuum manifold, tappi luer e raccordi rapidi	19413
Vacuum Pump*	Pompa da vuoto universale	84010 [USA e Canada] 84000 [Giappone] 84020 [resto del mondo]
QIAvac Connecting System*	Sistema per collegare il collettore da vuoto con la pompa da vuoto: include vassoio, flaconi per rifiuti, tubi, raccordi, valvole, manometri e 24 VacValves	19419

* Da utilizzare con i protocolli per il vuoto.

Per le informazioni aggiornate sulla licenza e le clausole di esclusione della responsabilità per i singoli prodotti, consultare il manuale del kit o il manuale utente QIAGEN specifico. I manuali dei kit e i manuali utente QIAGEN sono disponibili sul sito www.qiagen.com oppure possono essere richiesti al servizio di assistenza QIAGEN o al distributore locale.

Cronologia delle revisioni del manuale

Data	Modifiche
R4 09/2019	Cambiamento dell'uso previsto in acidi nucleici liberi solo da plasma umano. Inclusione del protocollo "Breeze". Nessun protocollo per urina e miRNA incluso. Aggiornamento delle informazioni sulla sicurezza.

Contratto di licenza limitato per QIAamp DSP Circulating NA Kit

L'utilizzo di questo prodotto comporta per l'acquirente o l'utente del prodotto l'accettazione dei seguenti termini:

1. Il prodotto può essere utilizzato esclusivamente in conformità ai protocolli forniti insieme al prodotto e al relativo manuale e soltanto con i componenti contenuti nel rispettivo kit. QIAGEN non concede nessuna licenza, nell'ambito della sua proprietà intellettuale, per l'utilizzo o l'integrazione dei componenti di questo kit con qualsiasi componente non incluso in questo kit, fatta eccezione per i protocolli forniti con il prodotto, il presente manuale e i protocolli aggiuntivi disponibili sul sito www.qiagen.com. Alcuni di questi protocolli aggiuntivi sono stati messi a punto da utenti QIAGEN a beneficio degli utenti QIAGEN. Si tratta di protocolli che non sono stati collaudati o ottimizzati da QIAGEN. QIAGEN non offre alcuna garanzia in merito a essi né alla violazione da parte di essi di eventuali diritti di terzi.
2. A parte le licenze espressamente dichiarate, QIAGEN non fornisce alcuna garanzia che questo kit e/o l'uso o gli usi dello stesso non costituiscano violazione dei diritti di terzi.
3. Questo kit e i relativi componenti sono concessi in licenza per un solo utilizzo e non possono essere riutilizzati, rinnovati o rivenduti.
4. QIAGEN esclude specificamente qualunque altra licenza, espressa o implicita, che non rientri tra quelle espressamente dichiarate.
5. L'acquirente e l'utente del kit acconsentono a non intraprendere e a non permettere a nessun altro di intraprendere qualsiasi iniziativa che possa determinare o agevolare qualunque azione di cui si fa divieto sopra. QIAGEN farà valere i divieti di questo Contratto di licenza limitata presso qualsiasi foro e otterrà il risarcimento di tutte le spese sostenute a scopo di indagine e consulenza legale, ivi comprese le parcelle degli avvocati, con riferimento a qualsiasi causa legale intentata per fare rispettare questo Contratto di licenza limitata o qualsiasi altro diritto di proprietà intellettuale correlato a questo kit e/o ai relativi componenti.

Per i termini di licenza aggiornati, visitare il sito www.qiagen.com.

Marchi commerciali: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp® (QIAGEN Group); BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company); Tween® (ICI Americas Inc.). I marchi registrati, i marchi di fabbrica ecc. utilizzati in questo documento, anche se non indicati in modo specifico come tali, non possono essere considerati non protetti dalla legge.

1118364 10/2019 HB-0466-005 © 2019 QIAGEN, tutti i diritti riservati.

