

Fevereiro 2017

Manual do kit QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue



Versão 1

IVD

Para utilização em diagnóstico in vitro



REF

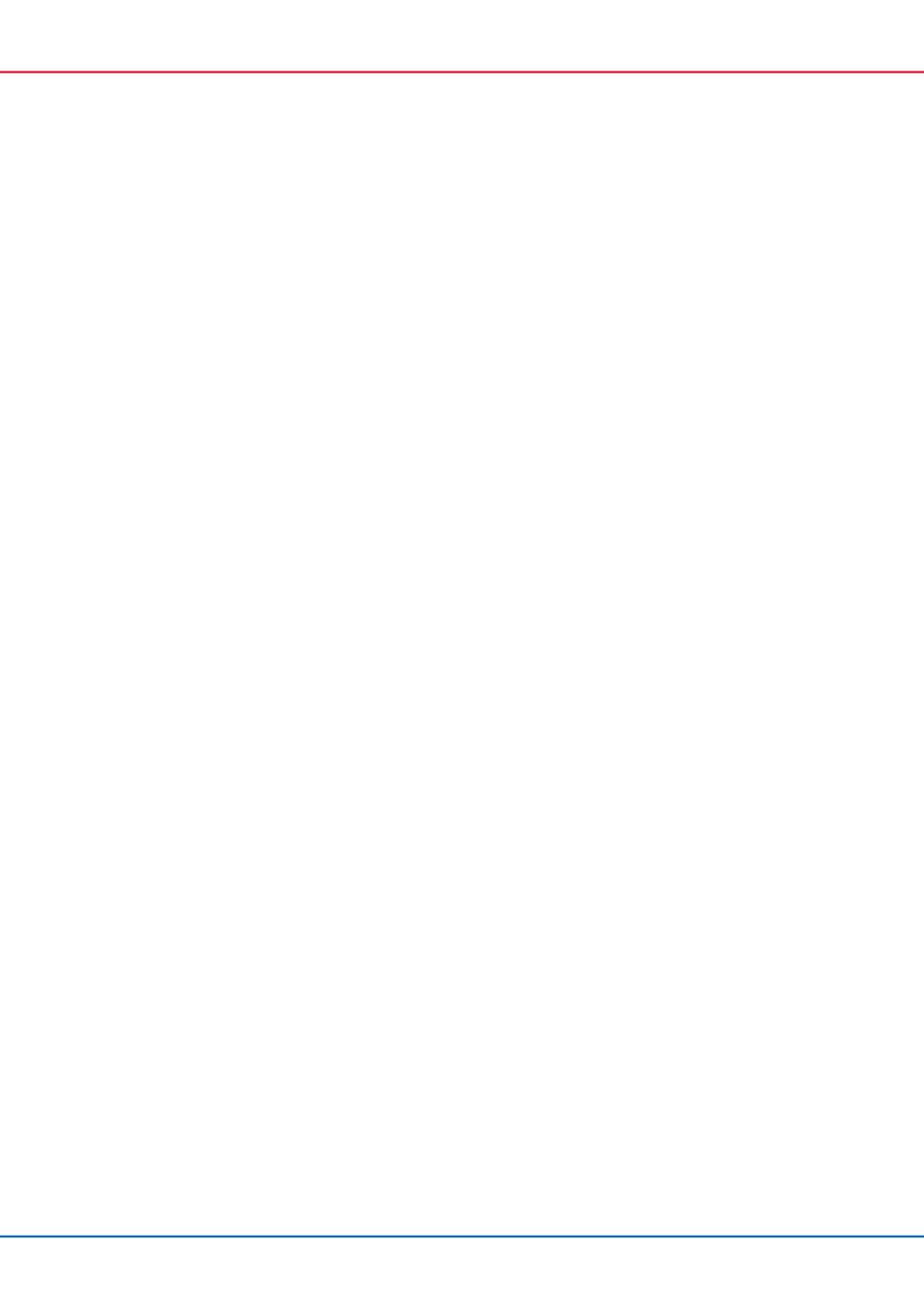
60404



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden,
ALEMANHA

R3 **MAT**

1062689PT



Índice

Utilização prevista	5
Resumo e explicação	5
Princípio do procedimento	6
Materiais fornecidos	8
Conteúdo do kit	8
Materiais necessários, mas não fornecidos	9
Advertências e precauções	10
Armazenamento e manuseamento de reagentes	11
Armazenamento e manuseamento de amostras	12
Procedimento	13
Preparação dos tampões	14
Material de origem	15
Procedimento de manuseamento para evitar contaminação cruzada	16
Centrifugação	17
Processar colunas QIAamp MinElute numa microcentrífuga	17
Eluição do ADN purificado	18
Protocolo: Isolamento de ADN genómico a partir de secções de tecido FFEP	19
Controlo da qualidade	23
Limitações	23
Características de desempenho	24
Símbolos	24
Informações de contacto	25
Informações para efetuar encomendas	26

Utilização prevista

O kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue é um sistema que usa a tecnologia de membrana de sílica (tecnologia QIAamp) para o isolamento e a purificação do ADN genómico de amostras biológicas com fixação por formalina e embebidas em parafina (FFEP).

O produto destina-se a ser utilizado por utilizadores profissionais, como técnicos e médicos, com formação em técnicas de biologia molecular para fins de diagnóstico *in vitro* (*in vitro* diagnostic, IVD); destina-se à preparação manual de amostras e não produz resultados de teste, sejam eles qualitativos ou quantitativos.

Resumo e explicação

O kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue é utilizado para purificação do ADN em secções de tecido FFEP. Utiliza tecnologia QIAamp DNA Micro bem estabelecida para purificação do ADN genómico ou mitocondrial a partir de amostras de pequena dimensão ou de pequeno volume. O kit combina as propriedades de ligação seletiva de uma membrana à base de sílica com volumes flexíveis de eluição.

As condições de lise permitem que o ADN genómico seja purificado eficientemente a partir de secções de tecido FFEP, sem necessidade de incubação de um dia para o outro. A incubação a uma temperatura elevada após a digestão da Proteinase K remove parcialmente a ligação cruzada da formalina do ADN libertado, melhorando potencialmente o rendimento, assim como o desempenho do ADN em ensaios a jusante. Atenção que o ADN isolado a partir de amostras FFEP tem geralmente um peso molecular mais baixo do que o ADN isolado a partir de amostras acabadas de colher ou congeladas. O grau de fragmentação depende do tipo e da idade da amostra, bem como das condições utilizadas na fixação.

A seguir à lise da amostra, o procedimento QIAamp DSP DNA FFPE Tissue simples é adequado para o processamento simultâneo de amostras múltiplas.

O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam cobertos pelos estudos de desempenho da QIAGEN descritos no manual.

Princípio do procedimento

O procedimento QIAamp DSP DNA FFPE Tissue é constituído por seis passos (Figura 1):

- Remoção da parafina: a parafina é dissolvida em xileno e removida
- Lise: a amostra é lisada a 56 °C em condições desnaturantes com Proteinase K
- Calor: a incubação a 90 °C inverte a ligação cruzada da formalina
- Ligação: o ADN liga-se à membrana e os contaminantes atravessam-na
- Lavagem: os contaminantes residuais são despejados
- Eluição: pura, o ADN concentrado é eluído a partir da membrana

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Procedure

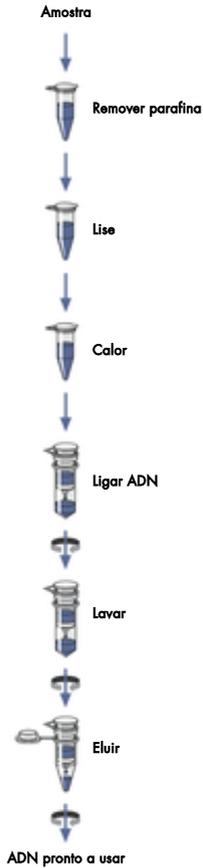


Figura 1. Procedimento do QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

Materiais fornecidos

Conteúdo do kit

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit			(50)
N.º de catálogo			60404
Número de reações			50
QIAamp MinElute®	QIAamp MinElute Columns with Wash Tubes (colunas QIAamp MinElute com tubos de lavagem)	COL	50
WT	Wash Tubes (tubos de lavagem) (2 ml)	WASH TUBE	3 x 50
ET	Elution Tubes (tubos de eluição) (1,5 ml)	ELU TUBE	50
LT	Lysis Tubes (tubos de lise) (2 ml)	LYS TUBE	50
ATL	Tissue Lysis Buffer (tampão de lise tecidular)	TIS LYS BUF	10 ml
AL	Lysis Buffer (tampão de lise)*	LYS BUF	12 ml
AW1	Wash Buffer 1* (tampão de lavagem 1) (concentrado)	WASH BUF 1 CONC	19 ml
AW2	Wash Buffer 2† (tampão de lavagem 2) (concentrado)	WASH BUF 2 CONC	13 ml
ATE	Elution Buffer (tampão de eluição)†	ELU BUF	12 ml
PK	Proteinase K	PROTK	1,25 ml
-	Instruções de utilização (manual)	HB	1

* Contém um sal de guanidina. Não compatível com desinfetantes que contenham lixívia. Consultar a página 10 para ver advertências e precauções.

† Contém azida sódica como conservante.

Materiais necessários, mas não fornecidos

Quando trabalhar com substâncias químicas, usar sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (safety data sheets, SDS) apropriadas, disponíveis no fornecedor do produto.

Reagentes

- Xileno
- Etanol (96 a 100%)*

Consumíveis

- Se tomar a decisão de não utilizar os tubos fornecidos no kit, recomendamos a utilização de tubos de microcentrifugação de 1,5 ml ou 2 ml (para os passos de lise) e tubos de microcentrifugação de 1,5 ml (para os passos de eluição) (disponíveis em Eppendorf® [Safe-Lock: N.º de cat. 022363204, EUA; N.º de cat. 0030 120.086, Europa], ou Sarstedt [N.º de cat. 72.690]). Recomendamos tubos de forma cônica isentos de DNase/RNase, com tampas de segurança.
- Pipetas e pontas de pipetas (para evitar a contaminação cruzada, recomendamos pontas de pipetas com barreiras para aerossóis)

Equipamento

- ThermoMixer†, incubador orbital aquecido, bloco de aquecimento ou banho-maria com capacidade de incubação a 56 °C, 70 °C e 90 °C
- Microcentrifuga† com rotor para tubos de 2 ml
- Misturador de vórtice

* Não utilizar álcool desnaturado, que contém outras substâncias, como o metanol ou a metililcetona.

† Para assegurar que as amostras são processadas adequadamente utilizando os procedimentos do QIAamp DSP DNA FFPE, recomenda-se que os aparelhos sejam calibrados de acordo com as recomendações do fabricante.

Advertências e precauções

Para utilização em diagnóstico *in vitro*

Quando trabalhar com substâncias químicas, usar sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para mais informações, consultar as fichas de dados de segurança (safety data sheets, SDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online no formato compacto e prático PDF em www.qiagen.com/safety, onde pode procurar, visualizar e imprimir as SDS de cada kit QIAGEN® e componente do kit.



ATENÇÃO: NÃO adicionar lixívia nem soluções ácidas diretamente aos resíduos provenientes da preparação de amostras.

Os tampões AL e AW1 contêm cloridrato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando combinado com lixívia.

Em caso de derramamento de algum líquido contendo os tampões referidos, limpar com detergentes apropriados para utilização em laboratório e água. Se o líquido derramado contiver agentes potencialmente infecciosos, limpar a área afetada primeiramente com detergente apropriado para utilização em laboratório e água e, depois, com 1% (v/v) de solução de hipoclorito de sódio.

As frases de perigo e precaução que se seguem aplicam-se aos componentes do kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Tampão AL



Contém: hidrócloro de guanidina; ácido maleico. Atenção! Pode ser nocivo por ingestão ou inalação. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. Caso a irritação ocular persista: consulte um médico. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

Tampão ATL



Atenção! Provoca uma ligeira irritação da pele. Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Tampão AW1



Contém: hidrócloro de guanidina. Atenção! Nocivo por ingestão ou inalação. Provoca irritação cutânea. Provoca irritação ocular grave. Caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Eliminar o conteúdo/recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar. Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial.

Proteinase K



Contém: Proteinase K. Perigo! Provoca uma ligeira irritação da pele. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Evitar respirar as poeiras/fumos/gases/névoas/vapores/aerossóis. Eliminar o conteúdo/recipiente em instalação aprovada de destruição de resíduos. Em caso de sintomas respiratórios: Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. EM CASO DE INALAÇÃO: Em caso de dificuldade respiratória, retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração. Usar protecção respiratória.

Armazenamento e manuseamento de reagentes

As colunas QIAamp MinElute devem ser armazenadas entre 2 e 8 °C após a entrega e podem ser utilizadas até à data de validade indicada na caixa do kit.

Todos os tampões podem ser armazenados à temperatura ambiente (15–25 °C) e permanecem estáveis até ao fim da data de validade. Contudo, os tampões reconstituídos AW1 e AW2 podem ser armazenados à temperatura ambiente (15–25 °C) durante o máximo de 1 ano ou até ao fim da data de validade, no caso do kit, consoante o que for mais curto.

O kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue contém uma solução de Proteinase K pronta a usar, que é fornecida num tampão de armazenamento especialmente formulado. A Proteinase K permanece estável até ao fim da data de validade do kit, quando armazenada à temperatura ambiente (15–25 °C).

Armazenamento e manuseamento de amostras

Os procedimentos padrão de fixação por formalina e de embebimento em parafina devem ser utilizados para limitar a extensão da fragmentação do ADN, por isso devemos ter o cuidado de:

- Fixar as amostras de tecido em formalina, de acordo com o protocolo do laboratório (a formalina tamponada neutra a 10% é geralmente aceite) o mais rapidamente possível após a remoção cirúrgica.
- Utilizar um tempo de fixação de 14–24 horas. Limitar os tempos de fixação como fixação prolongada (por exemplo >24 horas) pode dar origem a uma fragmentação do ADN mais grave, daí resultando um mau desempenho nos ensaios a jusante.
- Desidratar completamente as amostras antes de as embeber (a formalina residual pode inibir a digestão da Proteinase K).

O ADN é eluído em tampão ATE e fica imediatamente pronto a usar em reações de amplificação ou para armazenamento (condições dependentes dos requisitos do utilizador). Consultar os manuais do kit relevante para saber quais são as condições de armazenamento recomendadas para aplicações a jusante específicas da QIAGEN.

Procedimento

Aspetos importantes antes do início do procedimento

- Todos os reagentes fornecidos no kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue destinam-se a ser utilizados unicamente com os outros reagentes do mesmo kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue. Para se manter um nível de desempenho ideal, não se deve substituir os reagentes do kit.
- Após a receção do kit, verificar todos os componentes do mesmo quanto a danos. Se as embalagens ou os frascos de tampão apresentarem danos, contactar a Assistência Técnica ou o distribuidor local da QIAGEN. Em caso de derrame de líquido, consultar “Advertências e precauções”, página 10). Não utilizar componentes do kit que estejam danificados, já que a sua utilização pode ocasionar um funcionamento deficiente do mesmo.
- Não utilizar componentes de outros kits com o kit que está a ser utilizado em determinado momento, exceto quando tiverem números de lotes iguais.
- Evitar a contaminação microbiana dos reagentes do kit.
- Este kit apenas deve ser utilizado por pessoal com formação em práticas de diagnóstico *in vitro*.
- Usar sempre luvas de látex ou vinil para manusear os reagentes e as amostras de modo a evitar a contaminação a partir da superfície da pele ou de equipamento de laboratório com poeira. As mãos e partículas de pó podem transportar bactérias e fungos, sendo as fontes mais comuns de contaminação. Mudar frequentemente de luvas e manter os tubos fechados.
- Os tampões não utilizados, produtos residuais e restos de amostras devem ser eliminados de acordo com os procedimentos locais.
- Se estiver a utilizar os seus próprios recipientes de plástico, é recomendável utilizar tubos cónicos de 1,5–2ml de polipropileno descartáveis com fraca ligação isentos de DNase/RNase com tampas de segurança durante todo o procedimento de purificação.

- Executar todos os passos de centrifugação à temperatura ambiente (15–25 °C).
- Todos os tampões devem ser armazenados à temperatura ambiente (15–25 °C) e devem ser bem misturados antes de serem utilizados.
- Colocar um termomisturador ou incubador orbital aquecido a 56 °C para o utilizar no passo 11. Se não estiver disponível um termomisturador ou incubador orbital aquecido, pode ser utilizado em sua substituição um bloco de aquecimento ou um banho-maria.
- Se o tampão AL ou o tampão ATL contiverem precipitados, dissolver aquecendo a 70 °C com agitação lenta.
- Assegurar que o tampão AW1 e o tampão AW2 foram preparados de acordo com as instruções abaixo.
- Os procedimentos de controlo de qualidade da QIAGEN utilizam testes funcionais de libertação de kits para cada lote individual de kits. Por consequência, não misturar reagentes de lotes de kits diferentes e não combinar reagentes individuais de lotes de reagentes diferentes.

Preparação dos tampões

Preparação do tampão ATL

- Antes de se iniciar o procedimento, verificar se se formou precipitado no tampão ATL. Se necessário, dissolver por aquecimento a 70 °C com agitação lenta.

Preparação do tampão AL

- Antes de se iniciar o procedimento, verificar se se formou precipitado no tampão AL. Se necessário, dissolver por aquecimento a 70 °C com agitação lenta.

Preparação do tampão AW1

- Adicionar 25 ml de etanol (96–100%) ao frasco que contém 19 ml de tampão AW1 concentrado. Marcar a caixa de verificação no rótulo, para indicar que foi acrescentado etanol. O tampão reconstituído AW1 pode ser armazenado à temperatura ambiente (15–25 °C) durante o máximo de 1 ano ou até ao fim da data de validade do kit, consoante o que for mais curto. Recomendamos que a data de reconstituição seja escrita no rótulo do tampão.

Nota: Antes de iniciar o procedimento, misturar o tampão AW1 reconstituído agitando.

Preparação do tampão AW2

- Adicionar 30 ml de etanol (96–100%) ao frasco que contém 13 ml de tampão AW2 concentrado. Marcar a caixa de verificação no rótulo, para indicar que foi acrescentado etanol. O tampão reconstituído AW2 pode ser armazenado à temperatura ambiente (15–25 °C) durante o máximo de 1 ano ou até ao fim da data de validade do kit, consoante o que for mais curto. Recomendamos que a data de reconstituição seja escrita no rótulo do tampão.

Nota: Antes de iniciar o procedimento, misturar o tampão AW2 reconstituído agitando.

Material de origem

O material de origem para purificação do ADN são secções de corte de tecido FFPE (idealmente, acabado de cortar). Podem ser combinadas várias secções numa preparação. Se não dispuser de informações acerca da natureza do seu material de origem, recomendamos que não comece com mais de três secções por preparação.

O utilizador deve otimizar o número de secções, a espessura das mesmas e a respetiva área de todos os procedimentos utilizados no seu laboratório. Se o kit estiver a ser utilizado em conjunto com uma aplicação da QIAGEN a jusante, consultar o manual relevante para obter instruções.

Procedimento de manuseamento para evitar contaminação cruzada

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as precauções seguidamente indicadas são necessárias quando se manusearem colunas QIAamp MinElute, a fim de evitar contaminação cruzada entre amostras:

- Não encher demasiado os tubos com tecido.
- Trocar de bisturis entre amostras quando raspar o tecido.
- Aplicar cuidadosamente a amostra ou a solução na coluna QIAamp MinElute. Pipetar a amostra para dentro da coluna QIAamp MinElute sem molhar os bordos da coluna.
- Mudar sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Recomenda-se a utilização de pontas de pipetas com barreira para aerossóis.
- Utilizar sempre tubos de lavagem novos quando realizar passos de lavagem de amostras.
- Verificar se as tampas dos tubos estão totalmente fechadas antes de misturar com vórtex e de centrifugar.
- Verificar se a coluna QIAamp MinElute está totalmente fechada antes de centrifugar.
- Depois de todos os passos de vórtex pulsado e dos passos de incubação a 90 °C, centrifugar por instantes os tubos de microcentrifugação para remover as gotas do interior das tampas.
- Abrir apenas uma coluna QIAamp MinElute de cada vez e ter cautela para evitar a formação de aerossóis.
- Trocar sempre de bisturis entre amostras.
- Mudar sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Para minimizar a contaminação cruzada, recomenda-se a utilização de pontas de pipetas com barreira para aerossóis e que seja evitada a utilização de pipetas multistep.
- Utilizar sempre luvas descartáveis e verificar regularmente se podem estar contaminadas com material proveniente da amostra. Eliminar as luvas se suspeitar de que ficaram contaminadas.
- Abrir apenas um tubo de cada vez.

Centrifugação

As colunas QIAamp MinElute encaixam na maioria dos tubos de microcentrifugação padrão de 1,5–2 ml. Estão disponíveis em separado tubos de lavagem de 2 ml adicionais (QIAGEN, N.º de cat. 19201). A centrifugação das colunas QIAamp MinElute realiza-se a cerca de 6000 x g, para reduzir o ruído da centrífuga. A centrifugação à velocidade máxima não melhora os rendimentos do ADN. No entanto, é necessário fazer a centrifugação de colunas QIAamp MinElute à velocidade máxima em dois passos do procedimento: o passo de centrifugação a seco, depois de as membranas serem lavadas, e o passo de eluição. É também necessário fazer a centrifugação à velocidade máxima para sedimentar a amostra a seguir ao tratamento com xileno e ao passo de lavagem com etanol.

Todos os passos de centrifugação devem ser levados a cabo à temperatura ambiente (15–25 °C). Uma temperatura de centrifugação baixa pode dar origem a uma extração subótima.

Processar colunas QIAamp MinElute numa microcentrífuga

- Fechar sempre as colunas QIAamp MinElute antes de as colocar na microcentrífuga.
- Evitar tocar na membrana da coluna QIAamp MinElute com a ponta da pipeta.
- As frações contendo produtos residuais podem conter resíduos perigosos e devem ser devidamente eliminadas.
- Para um processamento eficiente de amostras múltiplas em paralelo, recomendamos o enchimento de um suporte com tubos de lavagem, para onde as colunas QIAamp MinElute possam ser transferidas depois da centrifugação. Os tubos de lavagem usados contendo produtos residuais podem ser eliminados e os tubos de lavagem novos contendo as colunas QIAamp MinElute podem ser colocados diretamente na microcentrífuga.
- Assegurar que é mantida a rastreabilidade total das amostras durante todo o processo.

Eluição do ADN purificado

Para aplicações a jusante que requerem pequenos volumes iniciais (por ex., alguns ensaios PCR), um eluato mais concentrado pode aumentar a sensibilidade do ensaio, mas também pode ter como resultado um aumento da concentração de potenciais inibidores.

Um aumento no volume de eluição baixa a concentração de ADN no eluato.

O volume de eluato recuperado pode ser aproximadamente 5 μ l inferior ao volume de tampão ATE aplicado na coluna QIAamp MinElute. Por exemplo, um volume de eluição de 20 μ l tem como resultado ≥ 15 μ l de eluato. O volume de eluato obtido depende da natureza da amostra.

É o utilizador quem tem a responsabilidade de otimizar o volume de eluição de todos os procedimentos utilizados no seu laboratório. Consultar os manuais do kit para saber quais são os volumes de eluição recomendados para aplicações a jusante específicas da QIAGEN.

Os rendimentos podem aumentar se a coluna for incubada com tampão ATE à temperatura ambiente, por exemplo, 5 minutos antes da centrifugação. O ADN eluído pode ser colhido em tubos de eluição de 1,5 ml (fornecidos). As condições de armazenamento do ADN eluído dependem dos requisitos definidos pelo utilizador. Consultar os manuais do kit para saber quais são as condições de armazenamento recomendadas para aplicações a jusante específicas da QIAGEN.

Protocolo: Isolamento de ADN genómico a partir de secções de tecido FFEP

Procedimento

1. Utilizando um bisturi, retirar o excesso de parafina do bloco de amostra.
2. Cortar secções de acordo com as práticas laboratoriais padrão (consultar “Material de origem”, página 15). O utilizador deve otimizar o número de secções, a espessura das mesmas e a respetiva área de todos os procedimentos utilizados no seu laboratório. Garantir que a rastreabilidade das amostras é mantida durante todo o procedimento.
3. Raspar imediatamente o tecido das secções utilizando um bisturi esterilizado num tubo de lise (fornecido). Certificar-se de que todo o tecido disponível é colocado no tubo. Adicionar 1 ml de xileno à amostra, fechar a tampa e agitar vigorosamente com vórtex, até a parafina se dissolver (por ex., 10 s). Certificar-se de que o tubo está totalmente fechado para evitar derrame de xileno, contaminação cruzada entre amostras e possível contacto com o xileno.

Nota: Utilizar o xileno em hottes de exaustão de gases ou outros equipamentos de contenção apropriados.

4. Centrifugar a toda a velocidade durante aproximadamente 2 min à temperatura ambiente, para recolher o pellet de tecido. Se não se formar nenhum pellet de tecido, repetir este passo.

Nota: Uma temperatura de centrifugação baixa pode dar origem a uma extração subótima.

5. Remover o sobrenadante pipetando e eliminá-lo. Reservar o pellet.
O sobrenadante contém xileno, que é um resíduo perigoso e deve ser devidamente eliminado, de acordo com os regulamentos locais.
6. Adicionar 1 ml de etanol (96–100%) ao pellet de tecido e misturar muito bem com vórtex.
O etanol extrai o xileno residual da amostra e deve ser devidamente eliminado.

7. Centrifugar a toda a velocidade durante aproximadamente 2 min à temperatura ambiente. Retirar o sobrenadante por meio de pipetagem. Não retirar nenhum dos pellets. Retirar cuidadosamente todo o etanol residual utilizando uma ponta de pipeta fina. Abrir o tubo e incubar a 15–40 °C, até todo o etanol residual se ter evaporado. A remoção do etanol residual é crucial para o êxito da extração.
Nota: Uma temperatura de incubação mais baixa torna mais lento o tempo de evaporação, enquanto uma temperatura mais alta pode secar demasiado o pellet dificultando a respetiva suspensão.
8. Ressuspender o pellet em 180 µl de tampão ATL. Adicionar 20 µl de Proteinase K e misturar com vórtex.
Nota: O pellet tem de ficar bem ressuspensado no tampão ATL para garantir o máximo de recuperação do rendimento.
9. Incubar a 56 °C ± 3 °C durante aproximadamente 1 h (até a amostra ter sido completamente lisada).
10. Incubar a 90 °C ± 5 °C durante 1 hora ± 5 min.
A incubação a 90 °C em tampão ATL inverte parcialmente a modificação do formaldeído dos ácidos nucleicos. Tempos de incubação mais curtos ou temperaturas de incubação mais baixas podem ter impacto na qualidade e quantidade do ADN. Se for utilizado apenas um bloco de aquecimento, deixar a amostra à temperatura ambiente a seguir à incubação a 56 °C, até o bloco de aquecimento ter atingido 90 °C.
11. Centrifugar o tubo, durante breves instantes, para remover gotas do interior da tampa.
12. Adicionar 200 µl de tampão AL à amostra e misturar muito bem com vórtex. Em seguida, adicionar 200 µl de etanol (96–100%) e misturar novamente muito bem com vórtex. É essencial que a amostra, o tampão AL e o etanol sejam misturados imediatamente e completamente com vórtex ou pipetando, para produzir uma solução homogénea. O tampão AL e o etanol podem ser pré-misturados e adicionados em conjunto num só passo, para poupar tempo quando são processadas várias amostras. Pode formar-se um precipitado branco ao adicionar o tampão AL e o etanol. Este precipitado não interfere com o procedimento QIAamp. Utilizar sempre mistura fresca e eliminá-la imediatamente após a utilização.

13. Centrifugar o tubo, durante breves instantes, para remover gotas do interior da tampa.
14. Transferir cuidadosamente todo o lisado para a coluna QIAamp MinElute (num tubo de lavagem de 2 ml), sem molhar os bordos, fechar a tampa e centrifugar a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Colocar a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem limpo de 2 ml (fornecido) e eliminar o tubo de lavagem que contém o produto residual.

Se o lisado não tiver passado completamente pela membrana depois da centrifugação, voltar a centrifugar a maior velocidade, até a coluna QIAamp MinElute ficar vazia.

15. Abrir, com cuidado, a coluna QIAamp MinElute e acrescentar 500 μ l de tampão AW1 reconstituído, sem molhar os bordos. Fechar a tampa e centrifugar a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Colocar a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem limpo de 2 ml e eliminar o tubo de lavagem que contém o produto residual.
16. Abrir, com cuidado, a coluna QIAamp MinElute e acrescentar 500 μ l de tampão AW2 reconstituído, sem molhar os bordos. Fechar a tampa e centrifugar a aproximadamente 6000 x g durante ≥ 1 min. Colocar a coluna QIAamp MinElute num tubo de lavagem limpo de 2 ml e eliminar o tubo de lavagem que contém o produto residual.

O contacto entre a coluna QIAamp MinElute e o produto residual deverá ser evitado. Não se esquecer de equilibrar o rotor da centrífuga. Alguns rotores de centrífuga podem vibrar ao desacelerar, fazendo com que o produto residual, que contém etanol, entre em contacto com a coluna QIAamp MinElute. Ter cuidado ao retirar a coluna QIAamp MinElute e o tubo de lavagem do rotor, para que o produto residual não entre em contacto com a coluna QIAamp MinElute.

17. Centrifugar à velocidade máxima (aproximadamente a 20 000 x g) durante aproximadamente 3 min para secar a membrana.
O "carry-over" de etanol para dentro do eluato pode interferir com algumas aplicações a jusante.

18. Colocar a coluna QIAamp MinElute num tubo de eluição limpo de 1,5 ml (fornecido) e eliminar o tubo de lavagem que contém o produto residual. Abrir, com cuidado, a tampa da coluna QIAamp MinElute e aplicar 20-200 µl de tampão ATE no centro da membrana.

IMPORTANTE: Se estiver a utilizar volumes de eluição pequenos (<50 µl), verter o tampão ATE no centro da membrana para garantir a eluição completa do ADN ligado. As colunas QIAamp MinElute proporcionam flexibilidade na escolha do volume de eluição. Escolher um volume de acordo com os requisitos da aplicação a jusante. O volume de eluato será aproximadamente 5 µl inferior ao volume da solução de eluição aplicado na coluna.

19. Fechar a tampa e incubar à temperatura ambiente (15–25 °C) durante pelo menos 1 min. Centrifugar à velocidade máxima (aproximadamente 20 000 x g) durante ≥1 min. A incubação da coluna QIAamp MinElute carregada com tampão ATE durante aproximadamente 5 min à temperatura ambiente antes da centrifugação pode aumentar o rendimento do ADN.

Controlo da qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade com Certificação ISO da QIAGEN, cada lote de kits QIAamp DSP DNA FFPE Tissue é testado segundo especificações predefinidas, com a finalidade de assegurar a constante qualidade do produto.

Limitações

O desempenho do kit foi estabelecido utilizando tecidos fixados por formalina e embebidos em parafina (tecidos FFPE) para isolamento do ADN genómico.

O utilizador é responsável por validar o desempenho do sistema para quaisquer procedimentos utilizados no seu laboratório que não estejam cobertos pelos estudos de desempenho da QIAGEN descritos no manual.

Para minimizar o risco de um impacto negativo nos resultados do diagnóstico, devem ser utilizados controlos adequados para aplicações a jusante. Para uma validação mais aprofundada, são recomendadas as diretrizes da International Conference on Harmonisation of Technical Requirements (Conferência Internacional sobre a Harmonização de Requisitos Técnicos, ICH) descritas em ICH Q2(R1) Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology (Validação de Procedimentos Analíticos: Texto e Metodologia)..

Todos os resultados de diagnóstico gerados têm de ser interpretados em conjunto com outras descobertas clínicas ou laboratoriais.

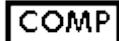
Se for utilizado o kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue, o ARN pode ser copurificado com o ADN, caso este esteja presente na amostra.

Características de desempenho

Consulte www.qiagen.com/p/QIAamp-DSP-DNA-FFPE-Tissue-CE para conhecer as características de desempenho do kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue.

Símbolos

Os símbolos que se seguem podem aparecer na embalagem e no rótulo:

Símbolo	Definição do símbolo
	Contém reagentes suficientes para <N> reações
	Prazo de validade
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Após a entrega
	Número de catálogo
	Número de lote
	Número do material
	Componentes
	Conteúdo
	Número

Símbolo

Definição do símbolo

	Anotar a data atual depois de adicionar etanol ao frasco
	Etanol
	Adicionar
	Hidrocloreto de guanidina
	Ácido maleico
	Número do item de comércio mundial
	Limites de temperatura
	Fabricante
	Consultar as instruções de utilização
	Atenção

Informações de contacto

Para obter assistência técnica e mais informações, consultar o nosso Centro de Suporte Técnico em www.qiagen.com/Support, ligar para 00800-22-44-6000 ou contactar um dos Departamentos da Assistência Técnica ou distribuidores locais da QIAGEN (consultar a contracapa do manual ou visitar www.qiagen.com).

Informações para efetuar encomendas

Produto	Conteúdo	N.º de cat.
Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue – para a purificação do ADN genómico em tecidos embebidos em parafina		
Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue (50)	Para 50 preparações de ADN: 50 colunas QIAamp MinElute®, Proteinase K, tampões, tubos de lavagem (2 ml), tubos de eluição (1,5 ml), tubos de lise (2 ml)	60404

Para informações atualizadas sobre licenciamento e avisos legais específicos do produto, consultar o respetivo guia ou o manual do utilizador do kit QIAGEN. Os manuais do kit QIAGEN e do utilizador estão disponíveis em www.qiagen.com ou podem ser solicitados à Assistência Técnica ou ao distribuidor local da QIAGEN.

Marcas comerciais: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, MinElute® (QIAGEN Group); Eppendorf® (Eppendorf AG).

Acordo de licença limitada para o Manual do Kit QIAamp DSP DNA FFPE Tissue

A utilização deste produto significa a aceitação, por parte de qualquer comprador ou utilizador do produto, dos seguintes termos:

1. O produto deverá ser usado unicamente em conformidade com os protocolos fornecidos com o produto e com o presente manual e recorrendo à utilização exclusiva de componentes contidos no kit. Nos termos dos direitos de propriedade intelectual, a QIAGEN não concede nenhuma licença para usar ou incluir os componentes englobados neste kit com qualquer componente não incluído neste kit, salvo conforme descrito nos protocolos fornecidos com o produto, no presente manual, e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em www.qiagen.com. Alguns dos referidos protocolos adicionais foram fornecidos por utilizadores QIAGEN para utilizadores QIAGEN. Os referidos protocolos não foram testados de forma exaustiva ou otimizados pela QIAGEN. A QIAGEN não assegura nem garante que os referidos protocolos não infringem os direitos de terceiros.
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a QIAGEN não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringam os direitos de terceiros.
3. Este kit e respetivos componentes estão licenciados para uma única utilização e não podem ser reutilizados, reconicionados ou objeto de revenda.
4. A QIAGEN não se responsabiliza especificamente por quaisquer outras licenças, expressas ou implícitas, salvo as expressamente declaradas.
5. O comprador e utilizador dos kits concorda em não tomar nem permitir que qualquer outra tome medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer dos atos acima proibidos. A QIAGEN pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de Licença Limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todas as custas de tribunal e de investigação em que incorra, incluindo honorários de advogados, em qualquer processo destinado a fazer cumprir o presente Contrato de Licença Limitada ou qualquer um dos seus direitos de propriedade intelectual relativos ao kit e/ou aos seus componentes.

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

Fev-17 HB-0414-004 © 2017 QIAGEN, todos os direitos reservados.

Encomendas www.qiagen.com/contact | Assistência técnica support.qiagen.com | Website www.qiagen.com