

Dezembro 2020

Ficha de protocolo do QIAAsymphony[®] SP

circDNA_2000_DSP_V2 e circDNA_4000_DSP_V2

Este documento é a ficha de protocolo do QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit, versão 2, R1

Informações gerais

Para uso em diagnóstico in vitro.

Este protocolo destina-se à purificação de DNA livre de células a partir de plasma e urina humanos recém-coletados ou congelados utilizando o QIAasymphony SP e o QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit.

Kit	QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit (n° de ref. 937556)	
Material da amostra	Plasma humano: EDTA ou citrato anticoagulado ou ccfDNA estabilizado Urina humana: não estabilizada ou estabilizada	
Nome do protocolo	circDNA_2000_DSP_V2	circDNA_4000_DSP_V2
Conjunto de controles de ensaio padrão	ACS_circDNA_2000_DSP_V2	ACS_circDNA_4000_DSP_V2
Volume de eluição	60 µl	60 µl
Versão de software necessária	Versão 4.0 ou superior	Versão 5.0 ou superior

Gaveta "Sample" (Amostra)

Tipo de amostra	Plasma humano (consulte "Preparo de material de amostra") e urina humana (estabilizada ou não estabilizada)
Volume de amostra	Depende do tipo de tubo de amostra utilizado Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com .
Tubos de amostra primários	n/a
Tubos de amostra secundários	Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com .
Introdutores	n/a
Outro	A proteinase K precisa ser adicionada à fenda A (posição 1 e/ou 2)

n/a = não aplicável.

Preparo da proteinase K na gaveta "Sample" (Amostra)

O QIAasymphony DSP Circulating DNA Kit contém solução de proteinase K pronta para uso que pode ser mantida à temperatura ambiente (15–25 °C).

Nota: Os tubos que contêm proteinase K são colocados em um porta-tubos. O tubo ou tubos que contenham a proteinase K devem ser colocados nas posições 1 e/ou 2 na fenda A da gaveta "Sample" (Amostra). Para o tipo de tubo necessário, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com.

Número de amostras*	circDNA_2000_DSP	circDNA_4000_DSP
8	1980 µl	2860 µl
24	3740 µl	6380 µl
48	6380 µl	11,660 µl
72	9020 µl	18,040 µl†
96	11,660 µl	23,320 µl†

* Para cada amostra, são necessários 110 µl para circDNA_2000_DSP ou 220 µl para circDNA_4000_DSP, mais um volume morto adicional de 1100 µl [(n x 110 ou 220 µl) + 1100 µl].

† Para circDNA_4000_DSP: Se mais de 48 amostras forem processadas, utilize um segundo tubo. O volume de carga máximo por tubo é de 11,660 µl. Para o segundo tubo, é necessário um volume morto adicional de 1100 µl.

Gaveta "Reagents and Consumables" (Reagentes e consumíveis)

Posição A1 e/ou A2	Cartucho de reagentes
Posição B1	n/a
Suporte de rack para ponteiras, 1-18	Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl ou 1500 µl
Suporte de caixa unitária, 1-4	Caixas unitárias com cartuchos de preparo de amostras ou 8-Rod Covers

n/a = não aplicável.

Gaveta "Waste" (Resíduos)

Suporte de caixa unitária, 1-4	Caixas unitárias vazias
Suporte de saco de resíduos	Saco de resíduos
Suporte de recipiente de resíduos líquidos	Recipiente de resíduos líquidos vazio

Gaveta "Eluate" (Eluato)

Rack de eluição (recomenda-se utilizar a fenda 1, na posição de resfriamento)	Para obter mais informações, consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com .
--	---

Materiais plásticos necessários

Protocolo circDNA_2000_DSP

Materiais plásticos	Um lote 24 amostras*	Dois lotes 48 amostras*	Três lotes 72 amostras*	Quatro lotes 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl†	28	56	84	112
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl†	56	112	168	224
Cartuchos de preparo de amostras‡	15	30	45	60
8-Rod Covers§	3	6	9	12

* O uso de menos de 24 amostras por lote reduz o número de ponteiras com filtro descartáveis necessárias por execução.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteira com filtro.

‡ O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por cartucho de reagentes.

§ Há 28 cartuchos de preparo de amostras por caixa unitária.

¶ Há doze 8-Rod Covers por caixa unitária.

Protocolo circDNA_4000_DSP

Materiais plásticos	Um lote 24 amostras*	Dois lotes 48 amostras*	Três lotes 72 amostras*	Quatro lotes 96 amostras*
Ponteiras com filtro descartáveis, 200 µl†	28	56	84	112
Ponteiras com filtro descartáveis, 1500 µl†‡	96	192	288	384
Cartuchos de preparo de amostras§	18	36	54	72
8-Rod Covers¶	3	6	9	12

* O uso de menos de 24 amostras por lote reduz o número de ponteiras com filtro descartáveis necessárias por execução.

† Há 32 ponteiras com filtro por rack para ponteira com filtro.

‡ O número necessário de ponteiras com filtro inclui as ponteiras com filtro para 1 verificação de inventário por cartucho de reagentes.

§ Há 28 cartuchos de preparo de amostras por caixa unitária.

¶ Há doze 8-Rod Covers por caixa unitária.

Nota: Dependendo das configurações, a quantidade de ponteiras com filtro referida pode diferir da quantidade exibida na tela sensível ao toque. Recomenda-se carregar o maior número possível de ponteiras.

Volume de eluição

Volume de eluição selecionado	Volume de eluição inicial
60 µl	75 µl

O volume de eluição é selecionado na tela sensível ao toque. O volume médio de eluição disponível é ≥ 60 µl. Em casos individuais, o volume de eluato final para amostras unitárias pode ser até 5 µl menor do que o volume selecionado (p. ex., 55 µl). Recomenda-se verificar o volume de eluato real ao utilizar um sistema de configuração de ensaio automatizado, que não verifica o volume de eluato antes da transferência.

Armazenamento de eluatos

Recomenda-se remover a placa de eluato da gaveta "Eluate" (Eluato) imediatamente após o término da execução. As placas de eluição podem ser deixadas no QIASymphony SP após a conclusão da execução do teste de um dia para o outro (máximo de 16 horas incluindo o tempo de execução; condições ambientais recomendadas: 18–26 °C e umidade relativa de 20–75%). Dependendo da temperatura e umidade, o eluato pode sofrer condensação ou evaporação.

Após o preparo da amostra, os eluatos podem ser armazenados a 2–8 °C por até 1 mês. Para um armazenamento a longo prazo, os eluatos podem ser mantidos a -30 a -15 °C ou a -90 a -65 °C. Os eluatos congelados não devem ser descongelados mais de 3 vezes.

Preparo de material de amostra

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

Pontos importantes antes de começar

- Evite a formação de espuma nas amostras ou sobre elas.
- As amostras devem ser equilibradas à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar a operação.

Plasma humano

As amostras de sangue tratadas com EDTA ou citrato como anticoagulante podem ser utilizadas para o preparo do plasma. O plasma preparado a partir dos tubos de coleta de sangue com ccfDNA estabilizado também pode ser utilizado. O plasma é gerado conforme especificado pelo fabricante.

Ao utilizar EDTA ou citrato como anticoagulante, recomenda-se conduzir a separação de plasma imediatamente após a doação de sangue.

Para determinadas aplicações a jusante, pode ser necessário excluir ou minimizar os ácidos nucleicos nas vesículas. Nestes casos, recomenda-se realizar um passo de centrifugação em alta velocidade a 16.000 x g por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) após a geração inicial do plasma.

Após a coleta e centrifugação, o plasma pode ser armazenado à temperatura ambiente por até 7 dias e a 2–8 °C por até 14 dias. Para um armazenamento prolongado, recomenda-se congelar as alíquotas a -20 °C ou -80 °C. O plasma congelado não deve ser descongelado mais de 3 vezes. O congelamento e descongelamento repetido leva à desnaturação e precipitação de proteínas, resultando potencialmente em uma redução dos rendimentos de ácidos nucleicos circulantes livres de células. Se os crioprecipitados ficarem visíveis nas amostras, centrifugue à 6.800 x g por 3 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) e transfira os sobrenadantes, sem agitar os péletes, para um tubo de amostra secundário (consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com). Inicie o procedimento de purificação imediatamente.

Urina humana

Devido à rápida degradação do DNA livre de células após a coleta da urina, recomenda-se veementemente a estabilização imediata das amostras de urina.

Urina humana estabilizada

A urina estabilizada pode ser armazenada à temperatura ambiente (15–25 °C) ou a 2–8 °C por até 7 dias. Para um armazenamento prolongado, recomenda-se congelar as alíquotas a -30 a -15 °C ou -90 a -65 °C.

As amostras de urina estabilizadas não necessitam de pré-tratamento de amostra. Após a estabilização, recomenda-se centrifugar as amostras de urina em baixa velocidade (1900 x g) por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) para remover as células antes da extração do DNA livre de células. Se os precipitados ficarem visíveis nos sobrenadantes após a centrifugação, aqueça as amostras até 25 °C em banho-maria para dissolvê-los. Antes de iniciar uma execução, transfira as amostras de urina estabilizadas para um tubo de amostra secundário e, em seguida, carregue esse tubo no porta-amostras (consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com).

Urina humana "não estabilizada"

Antes de iniciar um protocolo que exija Buffer ATL, verifique se há formação de precipitado no Buffer ATL. Se necessário, dissolva-o utilizando aquecimento a 70 °C, agitando-o suavemente em banho-maria. Aspire as bolhas presentes na superfície do Buffer ATL.

Nota: O Buffer ATL (Buffer ATL, 4 x 50 ml, n° de ref. 939016) não está incluso no QIAAsymphony DSP Circulating DNA Kit e deve ser encomendado separadamente.

Recomenda-se centrifugar as amostras de urina imediatamente após a coleta em baixa velocidade (1900 x g) por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C) para remover as células. As amostras de urina não estabilizadas necessitam de pré-tratamento de amostra.

Importante: Equilibre as amostras à temperatura ambiente (15–25 °C) antes de iniciar o pré-tratamento.

Importante: Deve-se realizar a centrifugação e o pré-tratamento dentro de 4 horas após a coleta da amostra de urina.

- Misture 2500 µl de urina (circDNA_2000_DSP) ou 4500 µl de urina (circDNA_4000_DSP) com 250 µl ou 450 µl de Buffer ATL, respectivamente.
- Incube as amostras à temperatura ambiente (15–25 °C) por 1 hora.

- Centrifugue as amostras a 1900 x g por 10 minutos à temperatura ambiente (15–25 °C).
Se os precipitados ficarem visíveis nos sobrenadantes após a centrifugação, aqueça as amostras até 25 °C em banho-maria para dissolvê-los.
- Transfira os sobrenadantes para um tubo de amostra secundário e, em seguida, carregue esse tubo no porta-amostras (consulte a lista de materiais de laboratório disponível na guia de recursos da página de produto em www.qiagen.com).

Importante: A estabilidade e integridade do DNA livre de células é limitada na urina não estabilizada. Recomenda-se carregar no máximo um lote de 24 amostras por execução de teste QIASymphony para minimizar o tempo das amostras de urina no equipamento.

Substâncias interferentes

As amostras de plasma com concentrações altas de gamaglobulina (> 30 g/l) podem reduzir a recuperação do DNA livre de células.

Histórico de revisões

Data	Alterações
Versão 2, R1 Dezembro 2020	Lançamento inicial.

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

Marcas registradas: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIASymphony® (Grupo QIAGEN). Os nomes registrados, marcas registradas, etc. utilizados neste documento, mesmo quando não marcados especificamente como tal, devem ser considerados protegidos pela lei.

12/2020 HB-2309-S02-001 © 2020 QIAGEN. Todos os direitos reservados.

Pedidos www.qiagen.com/shop | Suporte Técnico support.qiagen.com | Site www.qiagen.com