

Dezembro 2020

# Manual do PAXgene<sup>®</sup> Blood RNA Kit

Versão 2



50 (n.º de catálogo 762174)

R4 **MAT** 112212OPT

**REF** 762174



PreAnalytiX GmbH  
Feldbachstrasse, CH-8634 Hombrechtikon  
Produzido por QIAGEN GmbH para a PreAnalytiX



A QIAGEN / BD Company

Marcas comerciais: PAXgene®, PreAnalytiX® (PreAnalytiX GmbH); QIAGEN®, QIAcube® (QIAGEN Group), BD Vacutainer®, BD Hemogard™, Safety-Lok™ (Becton, Dickinson and Company), Eppendorf® (Eppendorf AG).

Os PAXgene Blood RNA Kits não estão disponíveis em todos os países; por favor informe-se.

#### **Contrato de licença limitada**

A utilização deste produto implica a aceitação dos seguintes termos por parte de qualquer comprador ou utilizador do PAXgene Blood RNA Kit:

1. O PAXgene Blood RNA Kit pode ser usado somente de acordo com o *Manual do PAXgene Blood RNA Kit* e apenas para utilização com os componentes contidos no Kit. A PreAnalytiX não concede nenhuma licença ao abrigo da sua propriedade intelectual para usar ou incorporar os componentes englobados neste kit em qualquer componente não incluído neste kit, exceto conforme descrito no *Manual do PAXgene Blood RNA Kit* e em quaisquer protocolos adicionais disponíveis em [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).
2. À exceção de licenças expressamente declaradas, a PreAnalytiX não fornece qualquer garantia de que este kit e/ou a sua utilização ou utilizações não infringem 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 PreAnalytiX recusa especificamente qualquer outra licença, expressa ou implícita, à exceção das expressamente declaradas.
5. O comprador e o utilizador do kit concordam em não tomar nem permitir que terceiros tomem medidas que possam conduzir a ou facilitar qualquer um dos atos acima proibidos.
6. A PreAnalytiX pode fazer cumprir as proibições do presente Contrato de licença limitada em qualquer tribunal e deverá recuperar todos os custos legais 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 seus componentes.

Para os termos de licença atualizados, consultar [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

#### **Venda condicional**

O presente produto é fornecido com uma licença ao abrigo de determinados pedidos de patentes, como sejam US-7,270,953 e US-7,682,790 dos Estados Unidos, assim como EP-1820793 B1 e equivalentes estrangeiras destes pedidos de patentes, para utilizar o produto no processamento do complexo de ácido nucleico formado durante a colheita de amostras num PAXgene Blood RNA Tube.

HB-0101-007 BD-8945 1122120 © 2005–2020 PreAnalytiX GmbH, todos os direitos reservados.

PreAnalytiX GmbH

Feldbachstrasse

CH – 8634 Hombrechtikon

Suíça

[www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com)

## **Distribuidores da PreAnalytiX**

Os produtos PreAnalytiX são produzidos e distribuídos pela QIAGEN ou BD para a PreAnalytiX. Não é possível encomendar produtos à PreAnalytiX GmbH.

Consulte a última página para obter informações de contacto do seu distribuidor local da PreAnalytiX.

# Índice

|   |    |
|---|----|
| Conteúdo do kit.....  | 5  |
| Símbolos .....  | 6  |
| Condições de armazenamento.....   | 8  |
| Utilização prevista.....  | 8  |
| Limitações de utilização do produto.....  | 9  |
| Controlo de qualidade .....   | 10 |
| Assistência técnica.....  | 10 |
| Informações de segurança.....   | 10 |
| Introdução .....  | 14 |
| Princípio e procedimento.....   | 14 |
| Colheita e estabilização da amostra.....  | 15 |
| Concentração e purificação do ARN .....   | 20 |
| Purificação manual de ARN.....  | 20 |
| Purificação automatizada de ARN .....   | 30 |
| Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador .....  | 39 |
| Notas importantes .....   | 42 |
| Utilizar instrumentos QIAcube .....   | 42 |
| Instalar protocolos nos instrumentos QIAcube .....  | 45 |
| Carregar os instrumentos QIAcube .....  | 46 |
| Protocolo: Purificação manual do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ..... | 58 |

|   |    |
|---|----|
| Protocolo: Purificação automatizada do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) ..... | 66 |
| Guia de resolução de problemas.....   | 74 |
| Apêndice A: Observações genéricas sobre a manipulação do ARN.....   | 77 |
| Apêndice B: Quantificação e determinação da qualidade do ARN total .....  | 78 |
| Apêndice C: Manipulação dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).....  | 80 |
| Informações para encomendas.....  | 81 |
| Histórico de revisões do manual .....   | 83 |

# Conteúdo do kit

| <b>PAXgene Blood RNA Kit</b> |   |   | <b>(50)</b>              |
|------------------------------|---|---|--------------------------|
| <b>N.º de catálogo</b>       |   |   | <b>762174</b>            |
| <b>Número de preparações</b> |   |   | <b>50</b>                |
| BR1                          | Resuspension Buffer (Tampão de ressuspensão)  | <b>RES BUF</b>  | 20 ml                    |
| BR2                          | Binding Buffer (Tampão de ligação)*   | <b>BIND BUF</b>   | 18 ml                    |
| BR3                          | Wash Buffer 1 (Tampão de lavagem 1)*  | <b>WASH BUF 1</b>   | 45 ml                    |
| BR4                          | Wash Buffer 2 (concentrate)<br>(Tampão de lavagem 2 [concentrado])†                               | <b>WASH BUF 2 CC</b>  | 11 ml                    |
| BR5                          | Elution Buffer (Tampão de eluição)  | <b>ELU BUF</b>  | 6 ml                     |
| RNFW                         | RNase-Free Water (bottle)<br>(Água livre de RNase [frasco])                                       | <b>PEL WASH</b>   | 2 × 125 ml               |
| PK                           | Proteinase K (tampa verde)  | <b>PROTK</b>  | 2 × 1,4 ml               |
| PRC                          | PAXgene RNA Spin Columns (red) (Colunas de rotação PAXgene RNA [vermelho])                        | <b>PAXgene RNA C</b>  | 5 × 10                   |
| PT                           | Processing Tubes (Tubos de processamento) (2 ml)  | <b>PROC TUBE</b>  | 6 × 50                   |
| Hemogard                     | Secondary BD Hemogard™ Closures (Tampas secundárias BD Hemogard™)                                 | <b>SEC CLOS</b>   | 50                       |
| MCT                          | Microcentrifuge Tubes (1.5 ml)<br>(Tubos de microcentrifugação [1,5 ml])                          | <b>MIC TUBE</b>   | 3 × 50, 1 × 10           |
| RNFD                         | DNase I, RNase-free (lyophilized)<br>(DNase I, livre de RNase [liofilizada])                      | <b>DNA REM</b>  | 1500 unidades de Kunitz† |
| RDD                          | DNA Digestion Buffer (white lid) (Tampão de digestão de ADN [tampa branca])                       | <b>DNA DIG BUF</b>  | 2 × 2 ml                 |
| DRB                          | DNase Resuspension Buffer (tube, lilac lid) (Tampão de ressuspensão de DNase [tubo, tampa lilás]) | <b>DNase RES BUF</b>  | 2 ml                     |
| PSC                          | PAXgene Shredder Spin Columns (lilac) (Colunas de rotação PAXgene Shredder [lilás])               | <b>PAXgene SHREI</b>  | 5 × 10                   |
| Manual                       | Manual do PAXgene Blood RNA Kit (Versão 2)  |  | 1                        |

# Símbolos



Contém reagentes suficientes para <N> testes



Consultar as instruções de utilização



Prazo de validade



Dispositivo médico de diagnóstico in vitro



Número de catálogo



Número de lote



Número do material



Componentes



Número



Método de esterilização através de radiação



Unidades de Kunitz



Adicionar



Conteúdo

\*Não compatível com reagentes de desinfecção que contenham lixívia. Contém um sal de guanidina. Consulte informações de segurança na página 10.

† O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

‡ As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente utilizadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento de  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

**RCNS**

Reconstituído

**DNase**

Desoxirribonuclease I

**EtOH**

Etanol

**GITC**

Isofocianato de guanidina

**RNase-Free DNase Set**

RNase-Free DNase Set

**GTIN**

Número global de item comercial



Não reutilizar



Limites de temperatura



Limite superior de temperatura



Fabricante



Nota importante

## Condições de armazenamento

As colunas de rotação PAXgene RNA (PRC), as colunas de rotação PAXgene Shredder (PSC), a proteinase K (PK) e os tampões (BR1, BR2, BR3, BR4 e BR5) devem ser armazenados secos à temperatura indicada no rótulo do kit.

O RNase-Free DNase Set, que contém DNase I (RNFD), tampão de digestão de ADN (RDD) e tampão de ressuspensão de DNase (DRB), é transportado à temperatura ambiente. Armazene todos os componentes do RNase-Free DNase Set imediatamente após a recepção, à temperatura indicada no rótulo. Quando armazenado adequadamente, o kit mantém-se estável até ao prazo de validade impresso na caixa do kit.

## Utilização prevista

O PAXgene Blood RNA System é composto por um tubo de colheita de sangue (PAXgene Blood RNA Tube, BRT) e um kit de purificação de ácidos nucleicos (PAXgene Blood RNA Kit). O sistema destina-se à colheita, armazenamento e transporte de amostras de sangue e estabilização de ARN intracelular num tubo de amostra fechado, assim como ao isolamento e purificação subsequentes de ARN hospedeiro de sangue total para RT-PCR utilizado em testes de diagnóstico molecular.

**As características de desempenho do PAXgene Blood RNA System apenas foram estabelecidas com as transcrições dos genes FOS e IL1B. O utilizador é responsável por estabelecer características de desempenho adequadas do PAXgene Blood RNA System para outras transcrições-alvo.**

## Indicações de utilização

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação de ARN intracelular de sangue total humano colhido no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Quando o kit é utilizado em conjunto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sistema fornece ARN intracelular purificado de sangue total para a RT-PCR utilizada em testes de diagnóstico molecular.

## Limitações de utilização do produto

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação de ARN intracelular do sangue total humano ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leucócitos/ml) para aplicações de diagnóstico in vitro. Não se destina à purificação de ADN genómico nem de ácidos nucleicos virais a partir de sangue total humano. Dado o número limitado de transcrições validadas para as especificações de estabilização (transcrições dos genes FOS e IL1B), não é possível estabelecer características de desempenho para todas as transcrições. Os utilizadores devem proceder à revisão dos dados do fabricante e dos seus próprios dados para determinar se é necessária validação para outras transcrições.

O produto destina-se a utilizadores profissionais, tais como técnicos e médicos com formação em procedimentos de diagnóstico in vitro.

Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações sobre a utilização dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

# Controlo de qualidade

De acordo com o Sistema de Gestão da Qualidade certificado pela norma ISO da QIAGEN, todos os lotes do PAXgene Blood RNA Kit são testados face a especificações predeterminadas para garantir uma qualidade constante do produto.

# Assistência técnica

Na QIAGEN, orgulhamo-nos da qualidade e da disponibilidade do nosso suporte técnico. Os nossos departamentos de assistência técnica são compostos por cientistas experientes com vastos conhecimentos práticos e teóricos em biologia molecular e na utilização de produtos PreAnalytiX. Em caso de dúvidas relativamente ao PAXgene Blood RNA Kit, contacte-nos.

Para obter assistência técnica e mais informações, contacte os Serviços de assistência técnica da QIAGEN.

# Informações de segurança

Dentro da UE – Os utilizadores devem comunicar qualquer incidente grave relacionado com o dispositivo ao fabricante e à Autoridade nacional competente. Fora da UE – Contacte o representante local da QIAGEN para comunicar qualquer incidente ou questão relacionados com o dispositivo.

Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção.

Para minimizar o risco de infecção (por exemplo, por vírus VIH ou da hepatite B) ou lesões durante o trabalho com materiais biológicos e químicos, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) apropriadas. Estas estão disponíveis online em formato PDF prático e compacto através do site [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com), onde pode procurar, visualizar e imprimir as FDS para este kit.

**CUIDADO**



NÃO adicione lixívia nem soluções ácidas diretamente aos resíduos provenientes da preparação de amostras.

O tampão de ligação (BR2) e o tampão de lavagem 1 (BR3) contêm tiocianato de guanidina, que pode formar compostos altamente reativos quando combinado com lixívia. Se o tampão de ligação (BR2) ou o tampão de lavagem 1 (BR3) forem derramados, limpe com detergente laboratorial adequado e água. Se for derramado líquido com agentes potencialmente infecciosos, limpe a área afetada primeiro com detergente laboratorial e água e depois com hipoclorito de sódio (lixívia) a 1% (v/v).

A mistura de sangue e solução de estabilização de ARN do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) pode ser desinfetada utilizando 1 volume de solução comercial de lixívia (hipoclorito de sódio a 5%) por 9 volumes de mistura de sangue e solução de estabilização de ARN.

Os resíduos resultantes da preparação da amostra, tais como sobrenadantes resultantes dos passos de centrifugação no procedimento de purificação do ARN, devem ser considerados como potencialmente infecciosos. Antes de os eliminar, os resíduos devem ser esterilizados em autoclave ou incinerados para destruir qualquer material infeccioso. A eliminação deve ser feita de acordo com os regulamentos oficiais.

As frases que se seguem, de perigo e precaução, aplicam-se aos componentes do PAXgene Blood RNA Kit. Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter informações de segurança sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

### Tampão BR2



Contém: tiocianato de guanidina. Perigo! Nocivo por ingestão. Pode ser prejudicial em contacto com a pele e se inalado. Provoca lesões oculares graves. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. **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. Continue a enxaguar. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

### Tampão BR3



Contém: etanol, tiocianato de guanidina. Perigo! Líquido e vapor inflamáveis. Provoca lesões oculares graves. O contacto com ácidos liberta um gás muito tóxico. Manter afastado de calor/faíscas/chamas a descoberto/superfícies quentes. Não fumar. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. **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. Continue a enxaguar. Contactar imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

### **DNase I**



Conteúdo: DNase. Perigo! Pode provocar uma reação alérgica cutânea. Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias. Evitar respirar pós/fumos/gases/vapores/névoas. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Usar proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

### **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 pós/fumos/gases/vapores/névoas. Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Usar proteção respiratória. EM CASO DE exposição ou suspeita de exposição: contactar um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

# Introdução

A colheita de sangue total constitui o primeiro passo em muitos ensaios moleculares utilizados para estudar o ARN celular. No entanto, um importante problema nestas experiências consiste na instabilidade do perfil do ARN celular *in vitro*. Os estudos efetuados pela PreAnalytiX mostraram que o número de cópias das espécies individuais de ARNm em sangue total se pode alterar mais de 1000 vezes durante o armazenamento ou transporte à temperatura ambiente.\* Tal é provocado pela rápida degradação do ARN e pela expressão induzida de alguns genes depois da colheita do sangue. Estas alterações do perfil do ARN tornam impossível a realização de estudos fiáveis da expressão génica. Por conseguinte, torna-se essencial um método que conserve o perfil de expressão do ARN durante e depois da flebotomia para permitir uma análise rigorosa da expressão génica no sangue total humano.

## Princípio e procedimento

A PreAnalytiX desenvolveu um sistema que permite a colheita, estabilização, armazenamento e transporte de amostras de sangue total humano com um protocolo rápido e eficiente para a purificação de ARN intracelular. O sistema requer a utilização dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; patentes dos EUA 6,602,718 e 6,617,170) para a colheita de sangue e estabilização de ARN, seguida pela purificação manual ou automatizada de ARN utilizando o PAXgene Blood RNA Kit. Os protocolos manual e automatizado proporcionam um desempenho substancialmente equivalente no que se refere à qualidade e rendimento de ARN. Neste manual, estão incluídos os dados de desempenho para o protocolo manual (páginas 23–30) e protocolo automatizado (páginas 32–36).



O QIAcube Connect MDx da QIAGEN não está disponível em todos os países. Para obter mais detalhes, consulte os Serviços de Assistência da QIAGEN.

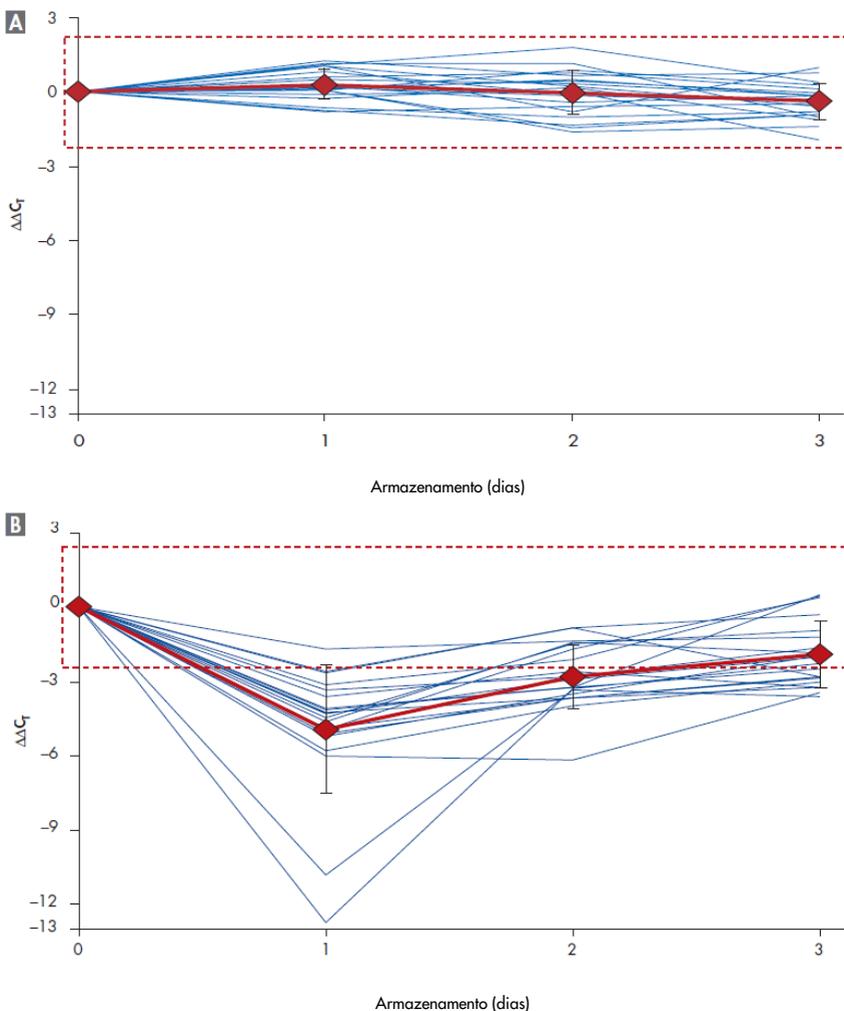
\* Rainen, L. et al. (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin. Chem.* **48**, 1883.

## Colheita e estabilização da amostra

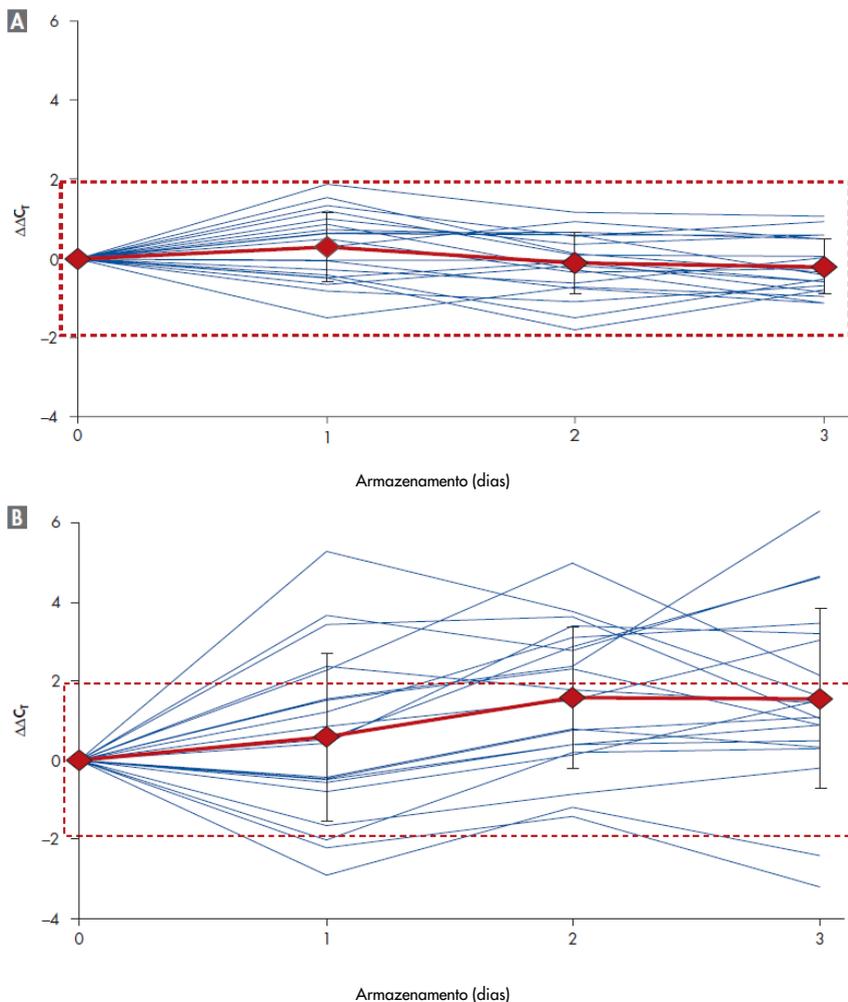
Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) contêm uma composição de reagentes proprietária, baseada numa tecnologia de estabilização do ARN patenteada. Este reagente protege as moléculas de ARN da degradação por RNases e reduz as modificações ex-vivo da expressão génica ao mínimo. Os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) destinam-se à colheita de sangue total humano e estabilização de ARN celular durante até 3 dias a 18–25 °C (Figuras 1 e 2, páginas 16 e 17) ou até 5 dias a 2–8 °C (Figuras 3 e 4, páginas 18 e 19). Os dados atualmente disponíveis mostram estabilização do ARN celular durante um período mínimo de 11 anos a –20 °C ou –70 °C\*. Para obter mais informações provenientes de estudos em curso que avaliam a estabilidade durante períodos de tempo mais longos, contacte os Serviços de assistência técnica da QIAGEN.

A duração real da estabilização do ARN pode variar, dependendo da espécie de ARN celular e da aplicação a jusante utilizada. Dado o número limitado de transcrições validadas para as especificações de estabilização (transcrições dos genes FOS e IL1B), não é possível estabelecer características de desempenho para todas as transcrições. Os utilizadores devem proceder à revisão dos dados do fabricante e dos seus próprios dados para determinar se é necessária validação para outras transcrições.

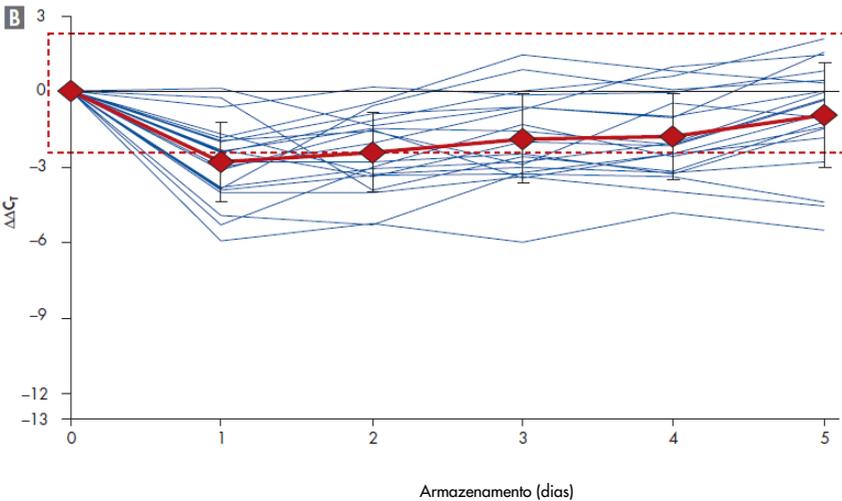
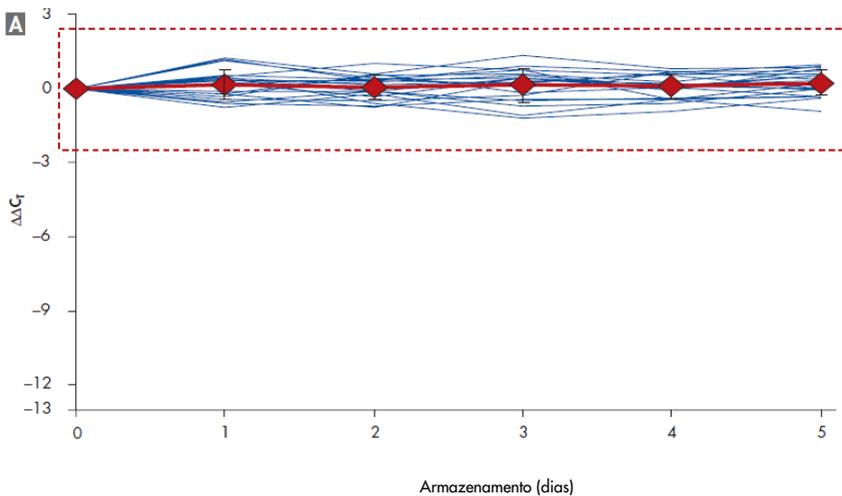
\* Está em curso um estudo de longa duração sobre a conservação de sangue em PAXgene Blood RNA Tubes.



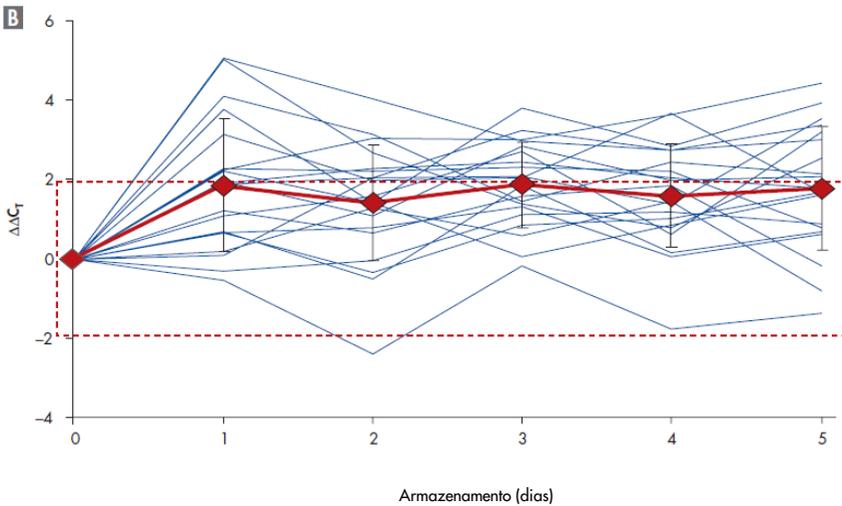
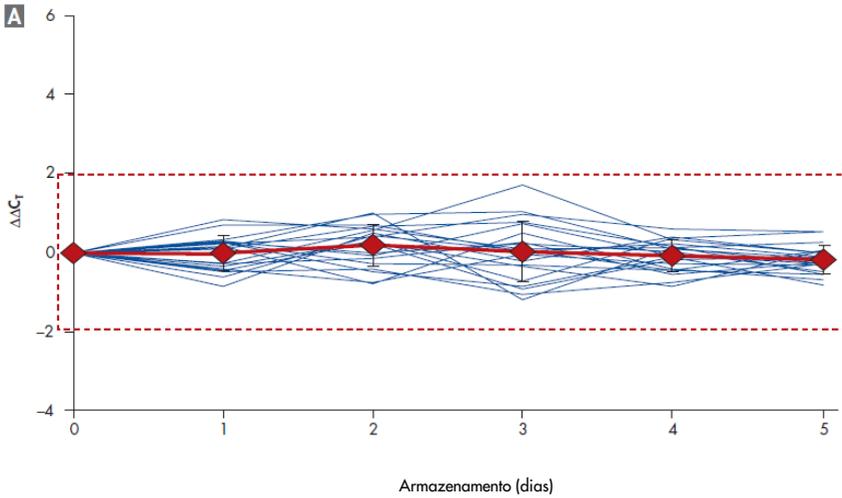
**Figura 1. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 18–25 °C: FOS.** Foi colhido sangue a 10 doadores, com amostras duplicadas e armazenadas a 18–25 °C durante o número de dias indicado, seguido por purificação do ARN total. **[A]** Procedeu-se à colheita de sangue, que foi armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), e o ARN total foi purificado utilizando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi colhido e armazenado em tubos de colheita de sangue padrão com EDTA como anticoagulante e o ARN total foi purificado com um método de extração padrão com solvente orgânico que inclui a limpeza do ARN baseada em membrana de gel de sílica. Os níveis de transcrição relativos ao FOS foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3 \times$  do ensaio ( $2,34 C_t$ ).



**Figura 2. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 18–25 °C: IL1B.** Procedeu-se à colheita de sangue e à purificação do ARN total, após armazenamento a 18–25 °C, conforme descrito na Figura 1. Os níveis de transcrição relativos ao IL1B foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3x$  do ensaio (1,93  $C_t$ ).



**Figura 3. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 2-8 °C: FOS.** Foi colhido sangue a 10 doadores, com amostras duplicadas e armazenadas a 2-8°C durante o número de dias indicado, seguido por purificação do ARN total. **[A]** Procedeu-se à colheita de sangue, que foi armazenado em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT), e o ARN total foi purificado utilizando o PAXgene Blood RNA Kit. **[B]** O sangue foi colhido e armazenado em tubos de colheita de sangue padrão com EDTA como anticoagulante e o ARN total foi purificado com um método de extração padrão com solvente orgânico que inclui a limpeza do ARN baseada em membrana de gel de sílica. Os níveis de transcrição relativos ao FOS foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3x$  do ensaio ( $2,34 C_t$ ).



**Figura 4. Estabilidade de ARN em amostras de sangue a 2-8 °C: IL1B.** Procedeu-se à colheita de sangue e à purificação do ARN total, após armazenamento a 2-8°C, conforme descrito na Figura 3. Os níveis de transcrição relativos ao IL1B foram determinados utilizando a RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. Traçam-se os valores para todas as amostras, mostrando-se os desvios médios e padrão. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3\times$  do ensaio ( $1,93 C_t$ ).

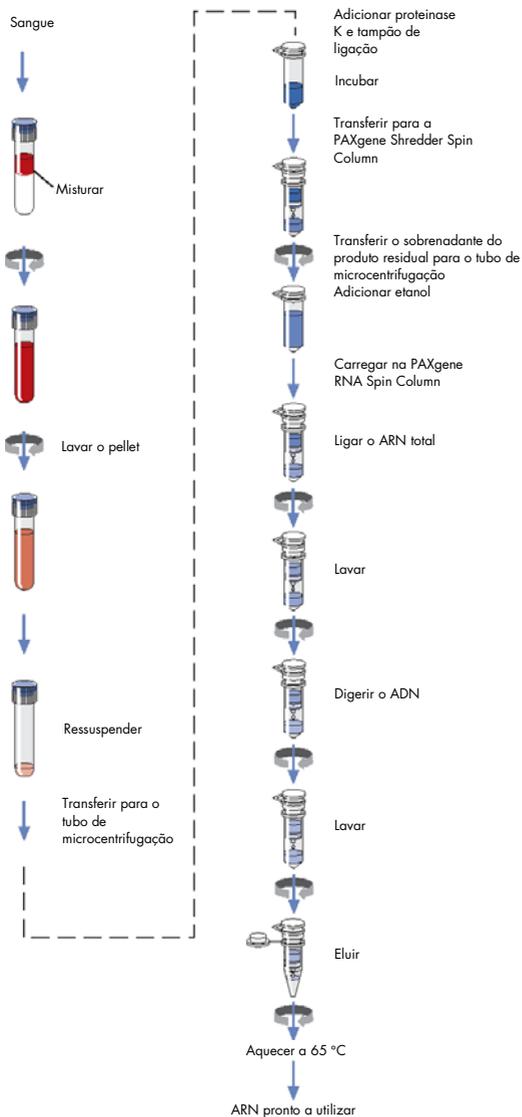
## Concentração e purificação do ARN

O PAXgene Blood RNA Kit destina-se à purificação do ARN total de 2,5 ml de sangue total humano colhido num PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O procedimento é simples e pode ser efetuado utilizando um procedimento manual ou automatizado (consulte as Figuras 5 e 10, páginas 21 e 31). Nos dois protocolos, a purificação inicia-se com um passo de centrifugação para formar um pellet de ácidos nucleicos no PAXgene Blood RNA Tube (BRT). O pellet é lavado e ressuspensão, seguido por purificação manual ou automatizada do ARN. Em princípio, os dois protocolos seguem os mesmos passos do protocolo com os mesmos componentes do kit.

### Purificação manual de ARN

Em pormenor, o pellet ressuspensão é incubado em tampões otimizados, juntamente com proteinase K (PK), para provocar a digestão de proteínas. É efetuada uma centrifugação adicional através da coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC) para homogeneizar o lisado de células e remover detritos celulares residuais. O sobrenadante da fração residual é transferido para um tubo de microcentrifugação limpo. Adiciona-se etanol para otimizar as condições de ligação, e o lisado é aplicado numa coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Durante uma curta centrifugação, o ARN liga-se, de forma seletiva, à membrana de gel de sílica PAXgene, à medida que os contaminantes a atravessam. Os contaminantes restantes são removidos em vários passos de lavagem eficiente. Entre o primeiro e segundo passo de lavagem, a membrana é tratada com DNase I (RNFD) para remover vestígios de ADN ligado. Depois dos passos de lavagem, o ARN é eluído em tampão de eluição (BR5) e desnaturado por calor.

O ARN total isolado com o PAXgene Blood RNA System é puro. Utilizando o protocolo manual, os valores de  $A_{260}/A_{280}$  estão entre 1,8 e 2,2 e está presente uma quantidade  $\leq 1\%$  (p/p) de ADN genómico numa quantidade  $\geq 95\%$  de todas as amostras, conforme determinado por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene da beta-actina. Pelo menos 95% das amostras não apresentam qualquer inibição em RT-PCR, quando se utiliza até 30% do eluato.

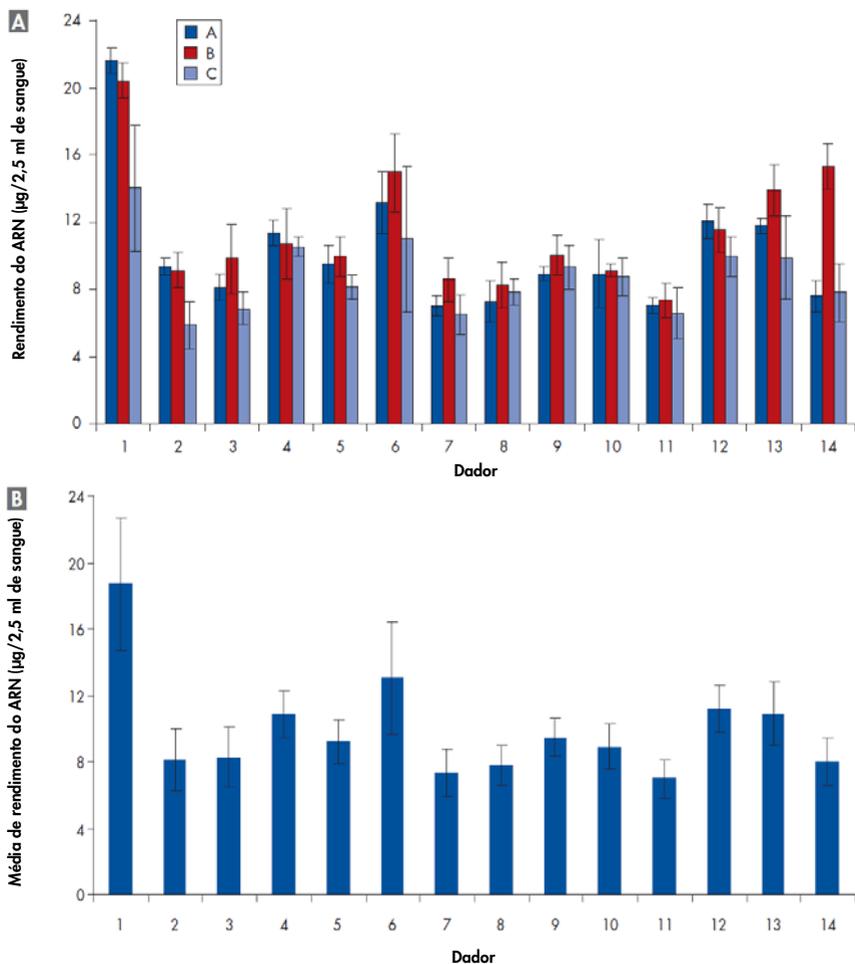


**Figura 5. O procedimento manual do PAXgene Blood RNA.**

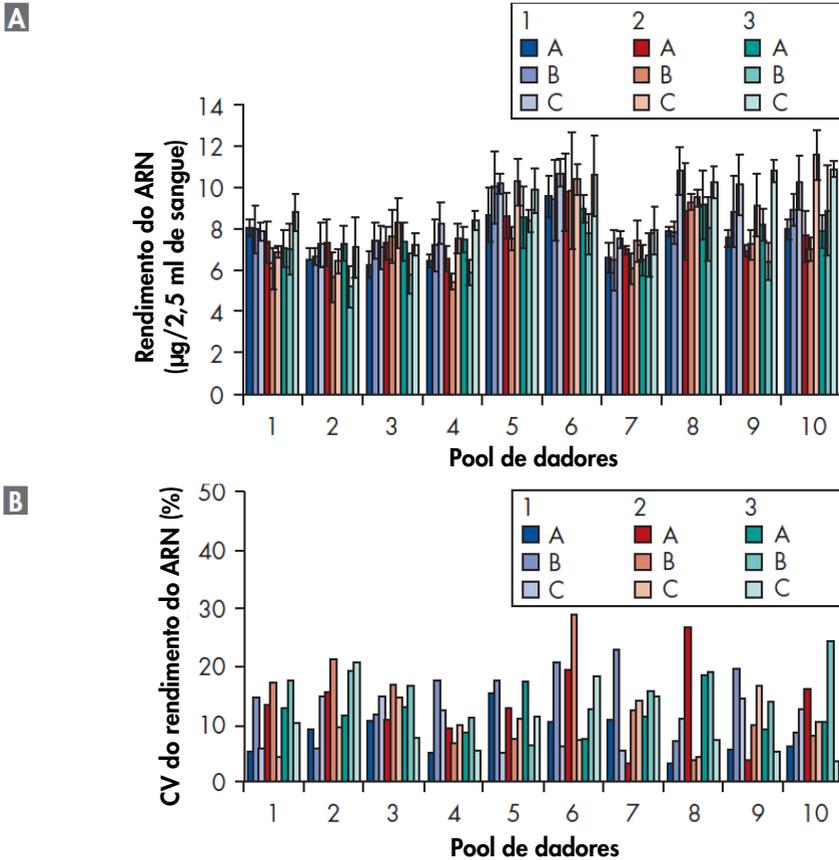
Usando o protocolo manual, o tempo médio de preparação da amostra (com base em dados de 12 ensaios de preparação de amostras) é de, aproximadamente, 90 minutos\*, com apenas 40 minutos de tempo de manipulação. Os rendimentos de ARN de 2,5 ml de sangue total humano saudável são  $\geq 3 \mu\text{g}$  para  $\geq 95\%$  das amostras processadas. Dado que os rendimentos são altamente dependentes do dador, os rendimentos individuais podem variar. Para dadores individuais, o sistema PAXgene Blood RNA oferece rendimentos altamente reprodutíveis e repetíveis (Figuras 6 e 7, páginas 23 e 24), assim como resultados da RT-PCR também reprodutíveis e repetíveis (Figuras 8 e 9, páginas 28 e 29), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.

A Figura 6 (página 23) mostra a reprodutibilidade e repetibilidade do PAXgene Blood RNA System. Foram realizados estudos adicionais para mostrar a influência de diferentes lotes de kits PAXgene Blood RNA e de diferentes técnicos na reprodutibilidade do rendimento do ARN e no desempenho da RT-PCR em tempo real. Dado que para estes estudos foram utilizadas amostras de sangue em pools em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais, os resultados não refletem a repetibilidade do sistema, incluindo a flutuação entre as colheitas de sangue individuais, mas apenas a repetibilidade da preparação das amostras (consulte a Figura 7, página 24).

\* Tempo de teste do protocolo total, incluindo manipulação adiada dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem do pellet e ressuspensão do pellet).



**Figura 6. Purificação de ARN reprodutível e repetível.** Amostras de sangue quadruplicadas de 14 dadores foram manualmente processadas por 3 técnicos de laboratórios diferentes (A, B, C). Utilizaram-se três conjuntos de equipamento e todas as amostras preparadas por um único técnico foram processadas usando o mesmo equipamento. **[A]** Mostram-se os desvios médios e padrão do rendimento de ARN por amostras replicadas dos mesmos dadores e de técnicos diferentes. **[B]** Doze amostras de sangue replicadas de cada um dos 14 dadores foram processadas pelos 3 técnicos diferentes. São apresentados os desvios médios e padrão do rendimento de ARN por amostras dos mesmos dadores e de todos os técnicos. Para todas as amostras de ARN, as relações de  $A_{260}/A_{280}$  variaram entre 1,8 e 2,2.



**Figura 7. Repetibilidade e reprodutibilidade do rendimento de ARN por técnicos diferentes e diferentes lotes do PAXgene Blood RNA Kit utilizando amostras de sangue de pools.** Foram colhidas amostras de sangue de 30 doadores diferentes em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT; 12 tubos por doador, 360 tubos no total). O conteúdo dos tubos de 3 doadores foi agrupado em pool e, subsequentemente, novamente dividido em 36 alíquotas de amostras. Estas 36 amostras por pool de 3 doadores foram processadas manualmente por 3 técnicos diferentes. Cada técnico utilizou 3 lotes diferentes do PAXgene Blood RNA Kit para a extração e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 10 pools de doadores. **[A]** Rendimento de ARN e desvio-padrão para combinação técnico-lote. Amostras de sangue quadruplicadas de 10 pools de doadores foram processadas por 3 técnicos diferentes (A, B, C) com cada um dos 3 lotes do kit (1, 2, 3). São apresentados os rendimentos médios (colunas) e desvios-padrão (barras de erro) por amostra quadruplicada do mesmo pool de doadores pelos diferentes técnicos e lotes de kit. **[B]** Coeficiente de variação (CV) do rendimento do ARN por pool de doadores para todas as combinações técnico-lote (A, B, C; 1, 2, 3) conforme calculado a partir do rendimento médio e desvio padrão do rendimento mostrados na Figura 7A.

**Tabela 1A. Reprodutibilidade em cada lote e utilizador para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)**

| Combinção de dados   | Pool de dadores 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> células/ml   |         |        |
|----------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                      | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                   | DP (µg) | CV (%) |
| Lote 1, utilizador A | 8,03  | 0,42    | 5      | 9,55  | 0,99    | 10     |
| Lote 1, utilizador B | 7,98  | 1,17    | 15     | 9,38  | 1,94    | 21     |
| Lote 1, utilizador C | 7,87  | 0,45    | 6      | 10,71   | 0,65    | 6      |
| Lote 2, utilizador A | 7,32  | 0,98    | 13     | 9,78  | 1,89    | 19     |
| Lote 2, utilizador B | 6,09  | 1,04    | 17     | 9,82  | 2,83    | 29     |
| Lote 2, utilizador C | 6,87  | 0,31    | 4      | 10,37   | 0,74    | 7      |
| Lote 3, utilizador A | 7,04  | 0,90    | 13     | 8,96  | 0,68    | 8      |
| Lote 3, utilizador B | 6,98  | 1,22    | 17     | 7,73  | 0,97    | 13     |
| Lote 3, utilizador C | 8,78  | 0,89    | 10     | 10,59   | 1,94    | 18     |
| Combinção de dados   | Pool de dadores 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        |
|                      | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                   | DP (µg) | CV (%) |
| Lote 1, utilizador A | 7,52  | 0,41    | 6      | 7,96  | 0,49    | 6      |
| Lote 1, utilizador B | 8,82  | 1,72    | 19     | 8,90  | 0,76    | 9      |
| Lote 1, utilizador C | 10,14   | 1,46    | 14     | 10,22   | 1,29    | 13     |
| Lote 2, utilizador A | 6,92  | 0,27    | 4      | 7,63  | 1,23    | 16     |
| Lote 2, utilizador B | 7,20  | 0,71    | 10     | 7,00  | 0,56    | 8      |
| Lote 2, utilizador C | 9,14  | 1,52    | 17     | 11,56   | 1,21    | 10     |
| Lote 3, utilizador A | 8,18  | 0,76    | 9      | 7,85  | 0,82    | 10     |
| Lote 3, utilizador B | 6,41  | 0,88    | 14     | 8,88  | 2,17    | 24     |
| Lote 3, utilizador C | 10,78   | 0,56    | 5      | 10,88   | 0,37    | 3      |

**Tabela 1B. Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)**

| Combinção de dados           | Pool de dadores 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> células/ml   |         |        |
|------------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                              | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                   | DP (µg) | CV (%) |
| Utilizador A, todos os lotes | 7,46  | 0,85    | 11     | 9,43  | 1,22    | 13     |
| Utilizador B, todos os lotes | 7,02  | 1,31    | 19     | 8,98  | 2,09    | 23     |
| Utilizador C, todos os lotes | 7,84  | 0,98    | 13     | 10,56   | 1,15    | 11     |
| Combinção de dados           | Pool de dadores 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        |
|                              | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                   | DP (µg) | CV (%) |
| Utilizador A, todos os lotes | 7,54  | 0,72    | 10     | 7,81  | 0,82    | 11     |
| Utilizador B, todos os lotes | 7,48  | 1,50    | 20     | 8,26  | 1,54    | 19     |
| Utilizador C, todos os lotes | 10,02   | 1,34    | 13     | 10,89   | 1,10    | 10     |

**Tabela 1C. Reprodutibilidade em cada lote e entre todos os utilizadores para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)**

| Combinção de dados            | Pool de dadores 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> células/ml   |         |        |
|-------------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                               | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                   | DP (µg) | CV (%) |
| Lote 1, todos os utilizadores | 7,96  | 0,69    | 9      | 9,88  | 1,34    | 14     |
| Lote 2, todos os utilizadores | 6,76  | 0,93    | 14     | 9,99  | 1,84    | 18     |
| Lote 3, todos os utilizadores | 7,60  | 1,27    | 17     | 9,09  | 1,71    | 19     |
| Combinção de dados            | Pool de dadores 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        |
|                               | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                   | DP (µg) | CV (%) |
| Lote 1, todos os utilizadores | 8,83  | 1,63    | 19     | 9,02  | 1,27    | 14     |
| Lote 2, todos os utilizadores | 7,75  | 1,36    | 18     | 8,73  | 2,31    | 26     |
| Lote 3, todos os utilizadores | 8,46  | 1,99    | 24     | 9,20  | 1,80    | 20     |

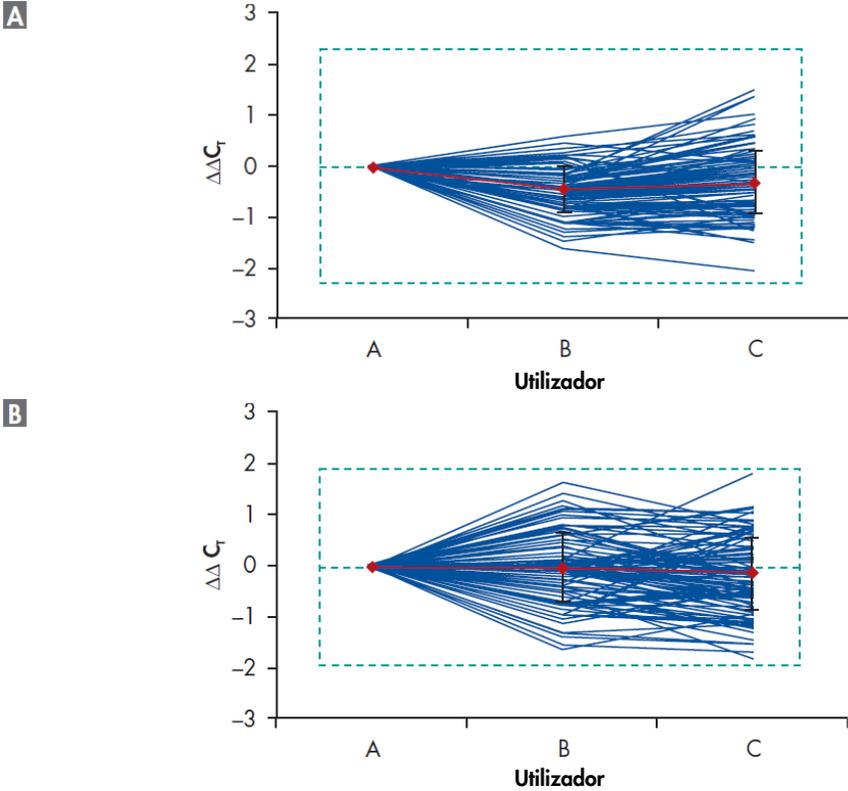
**Tabela 1D. Reprodutibilidade entre todos os lotes e todos os utilizadores para os pools de dadores seleccionados (1, 6, 9, 10)**

| Combinação de dados           | Pool de dadores 1<br>5,1 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 6<br>6,5 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        |
|-------------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                               | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) |
| Lote 1, todos os utilizadores | 7,44  | 1,09    | 15     | 9,66  | 1,65    | 17     |

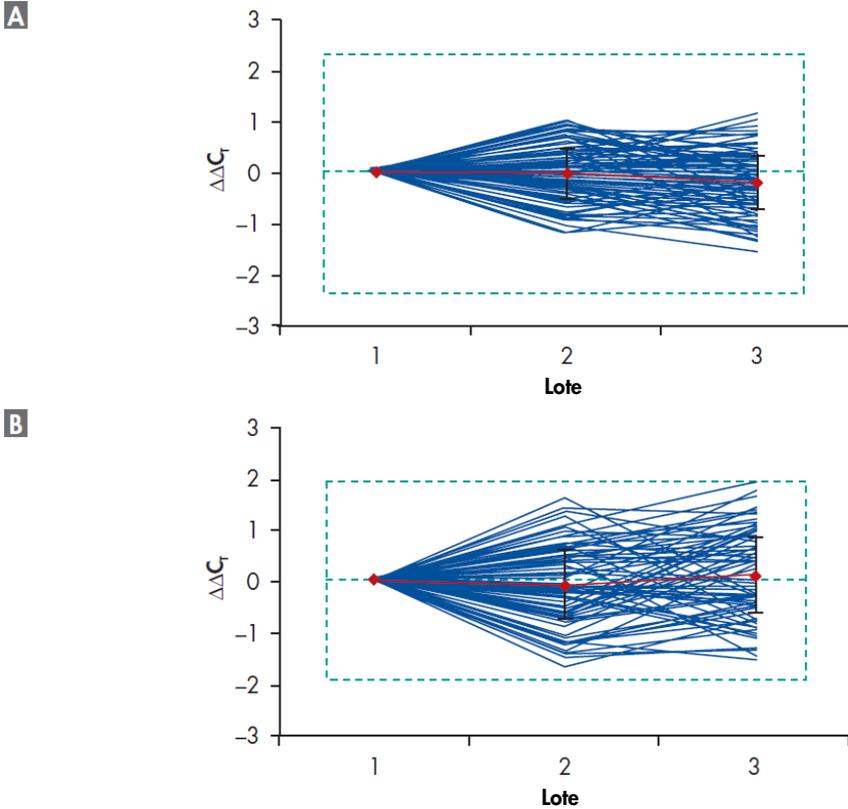
  

| Combinação de dados           | Pool de dadores 9<br>8,4 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        | Pool de dadores 10<br>10,2 x 10 <sup>6</sup> células/ml |         |        |
|-------------------------------|---|---------|--------|---|---------|--------|
|                               | Rendimento médio (µg)                                 | DP (µg) | CV (%) | Rendimento médio (µg)                                   | DP (µg) | CV (%) |
| Lote 1, todos os utilizadores | 8,35  | 1,70    | 20     | 8,99  | 1,80    | 20     |

Análise detalhada de 4 pools de dadores representativos. Os pools foram seleccionados de acordo com a contagem de glóbulos brancos e refletem os valores superior, médio e inferior do intervalo normal das contagens de glóbulos brancos ( $4,8 \times 10^6 - 1,1 \times 10^7$  leucócitos/ml). A contagem de glóbulos brancos representa o valor médio de 3 contagens de glóbulos brancos dos 3 dadores por pool de dadores.



**Figura 8. Reprodutibilidade da RT-PCR — entre utilizadores.** Foi utilizada a purificação de ARN na experiência descrita na Figura 7 para a RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcrição relativos do **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. São traçados os valores de todas as amostras, relativos aos valores para o utilizador A (10 pools de dados × 3 lotes de kit × 4 replicações = 120 conjuntos de dados para cada gene) com desvios médios (linhas vermelhas) e desvios-padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3\sigma$  dos ensaios (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).



**Figura 9. Reprodutibilidade de RT-PCR — entre lotes de kit.** Foi utilizada a purificação de ARN na experiência descrita na Figura 7 para a RT-PCR em tempo real. Os níveis de transcrição relativos do **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. São traçados os valores de todas as amostras, relativos aos valores para o lote 1 do kit (10 pools de dadores × 3 utilizadores × 4 replicações = 120 conjuntos de dados para cada gene) com desvios médios (linhas vermelhas) e desvios-padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3 \times$  dos ensaios (FOS: 2,34  $C_t$ ; IL1B: 1,93  $C_t$ ).

**Tabela 2. Resumo dos dados da RT-PCR das Figuras 8 e 9**

| Sistema de teste   | Ensaio FOS/18S ARNr          |                                 | Ensaio IL1B/18S ARNr         |                                 |
|--|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
|  | Média ( $\Delta\Delta C_T$ ) | $\pm$ DP ( $\Delta\Delta C_T$ ) | Média ( $\Delta\Delta C_T$ ) | $\pm$ DP ( $\Delta\Delta C_T$ ) |
| <b>Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes</b> |                              |                                 |                              |                                 |
| Todos os utilizadores, lote 1–lote 1                               | 0,00                         | 0,00                            | 0,00                         | 0,00                            |
| Todos os utilizadores, lote 1–lote 2                               | -0,03                        | 0,48                            | -0,07                        | 0,66                            |
| Todos os utilizadores, lote 1–lote 3                               | -0,21                        | 0,52                            | 0,11                         | 0,71                            |
| <b>Reprodutibilidade em cada utilizador e entre todos os lotes</b> |                              |                                 |                              |                                 |
| Todos os lotes, utilizador A–utilizador A                          | 0,00                         | 0,00                            | 0,00                         | 0,00                            |
| Todos os lotes, utilizador A–utilizador B                          | -0,46                        | 0,44                            | -0,06                        | 0,69                            |
| Todos os lotes, utilizador A–utilizador C                          | -0,31                        | 0,60                            | -0,15                        | 0,71                            |

Utilizador: técnico, efetuou o estudo.

Lote: número do lote do kit utilizado neste estudo.

DP: desvio-padrão.

Mostram-se os valores  $\Delta\Delta C_T$  médios (N=120) e os desvios-padrão para os dados apresentados nas Figuras 8 e 9.

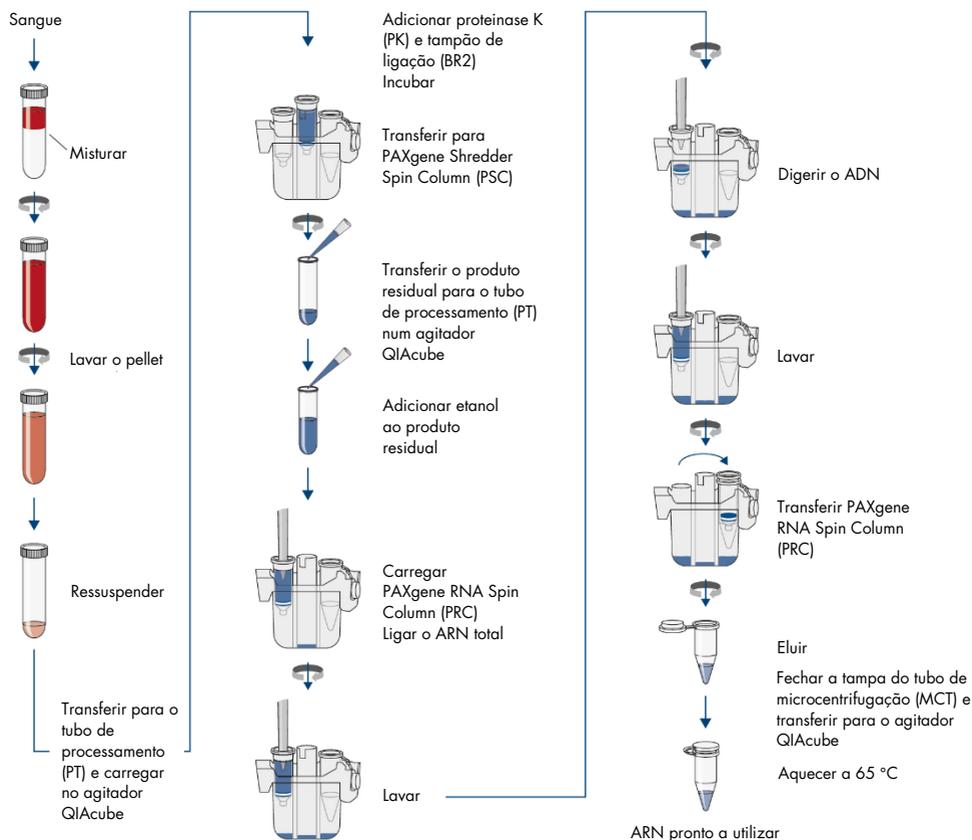
## Purificação automatizada de ARN

A purificação de ARN de sangue é automatizada no QIAcube Connect MDx da QIAGEN ou no QIAcube clássico da QIAGEN (doravante referido como QIAcube). Os instrumentos inovadores QIAcube utilizam tecnologia avançada para processar colunas de rotação da QIAGEN, permitindo uma integração perfeita da preparação automatizada de amostras de baixo rendimento no fluxo de trabalho do seu laboratório. A preparação de amostras com os instrumentos QIAcube segue os mesmos passos do procedimento manual (ou seja, lise, ligação, lavagem e eluição), permitindo continuar a utilizar o PAXgene Blood RNA Kit para purificação de ARN de alta qualidade.



**Figura 10. QIAcube Connect MDx.**

O protocolo de purificação automatizada de ARN é constituído por duas partes (ou protocolos), "PAXgene Blood RNA Part A" e "PAXgene Blood RNA Part B", com uma curta intervenção manual entre as duas partes (consulte a Figura 11, página 32).



**Figura 11. O procedimento automatizado do PAXgene Blood RNA.**

O pellet de ácidos nucleicos centrifugado, lavado e ressuspensão (consulte "Concentração e purificação do ARN", página 20) é transferido do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) para tubos de processamento (PT), que são colocados na unidade termoagitadora na mesa de trabalho dos instrumentos QIAcube. O técnico seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" a partir do menu. Os instrumentos QIAcube efetuam os passos do protocolo até à eluição do ARN em tampão de eluição (BR5). O técnico transfere os tubos de microcentrifugação (MCT), que contêm o ARN purificado, para a unidade termoagitadora dos instrumentos QIAcube. O técnico seleciona e inicia o protocolo "PAXgene Blood RNA Part B" a partir do menu e a desnaturação por calor é efetuada pelos instrumentos QIAcube.

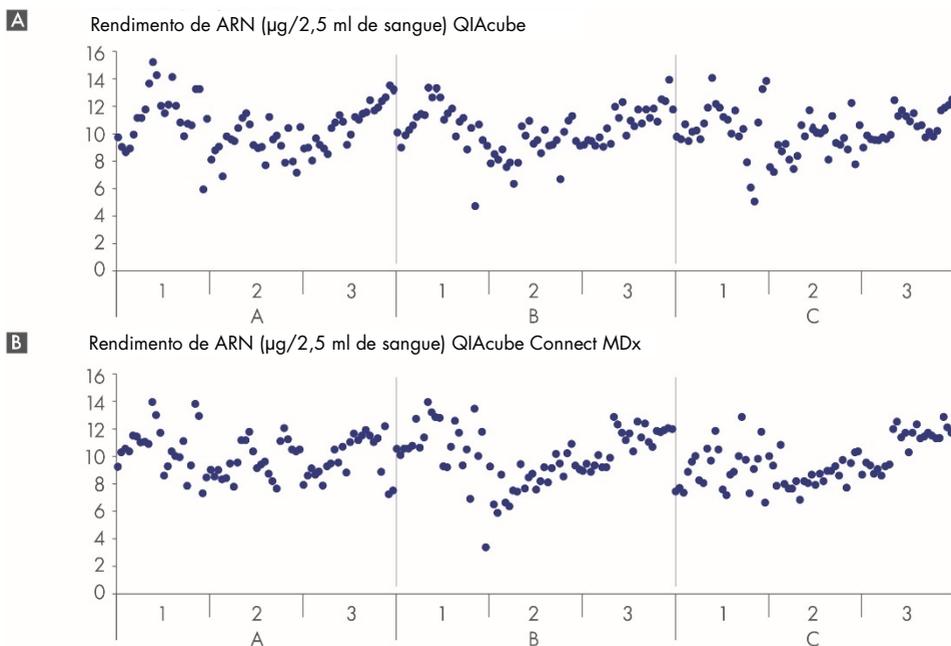
O tempo médio de preparação da amostra (com base em dados de 12 ensaios de preparação de amostras) é de 151 minutos\*, com significativamente menos tempo de manipulação em comparação com o protocolo manual.

Os rendimentos de ARN de 2,5 ml de sangue total humano saudável são  $\geq 3 \mu\text{g}$  para  $\geq 95\%$  das amostras processadas. Na Figura 12 (página 34) são indicados os rendimentos de ARN de um total de 216 amostras preparadas utilizando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 técnicos. Dado que para estes estudos se utilizaram amostras de sangue em pools em vez de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) individuais, os resultados não refletem o rendimento de ARN esperado com amostras individuais de colheitas de sangue individuais. Dado que os rendimentos são altamente dependentes do dador, os rendimentos individuais podem variar (Figura 12, página 34).

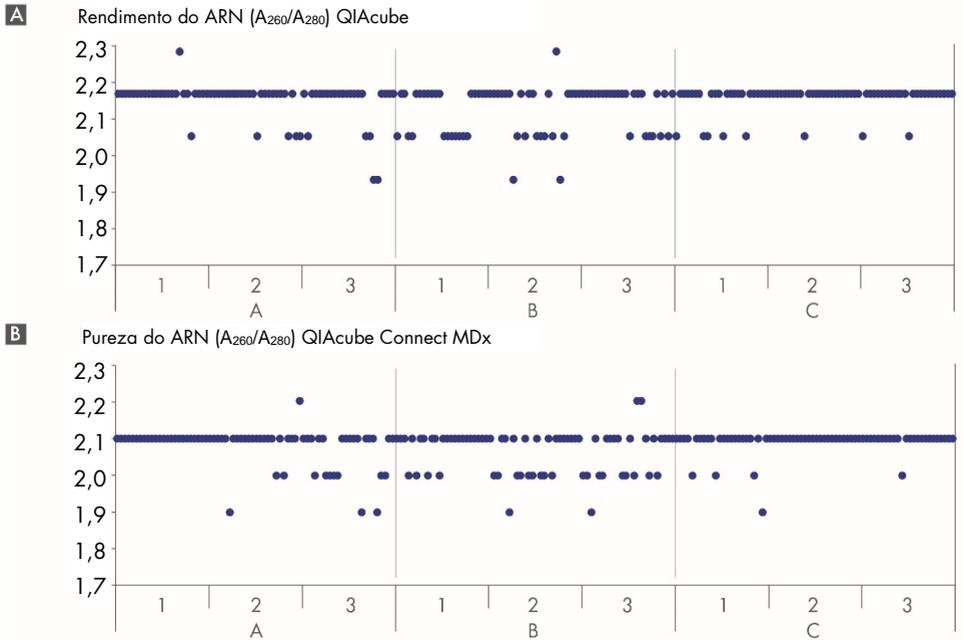
Pelo menos 95% das amostras não apresentam qualquer inibição em RT-PCR, quando se utiliza até 30% do eluato. Utilizando o protocolo automatizado, a contaminação cruzada entre amostras é indetetável, conforme determinado por RT-PCR quantitativa em tempo real de sequências de ABL1 e transcrições de FOS em amostras negativas para ARN (água) emparelhadas com amostras positivas para ARN (sangue total humano) no mesmo ensaio.

O ARN isolado com o PAXgene Blood RNA System e o protocolo automatizado apresentam pureza, conforme demonstrado por ausência de inibição na RT-PCR e pelos valores de  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,2. A quantidade de ADN genómico presente é  $\leq 1\%$  (p/p) numa quantidade  $\geq 95\%$  de todas as amostras, conforme determinado por real-time PCR quantitativa de uma sequência do gene da beta-actina. Nas Figuras 13 e 14 (páginas 35 e 36) mostram-se os valores de  $A_{260}/A_{280}$  e o ADN genómico relativo de um total de 216 amostras preparadas utilizando o protocolo automatizado com 3 lotes de kit por 3 técnicos.

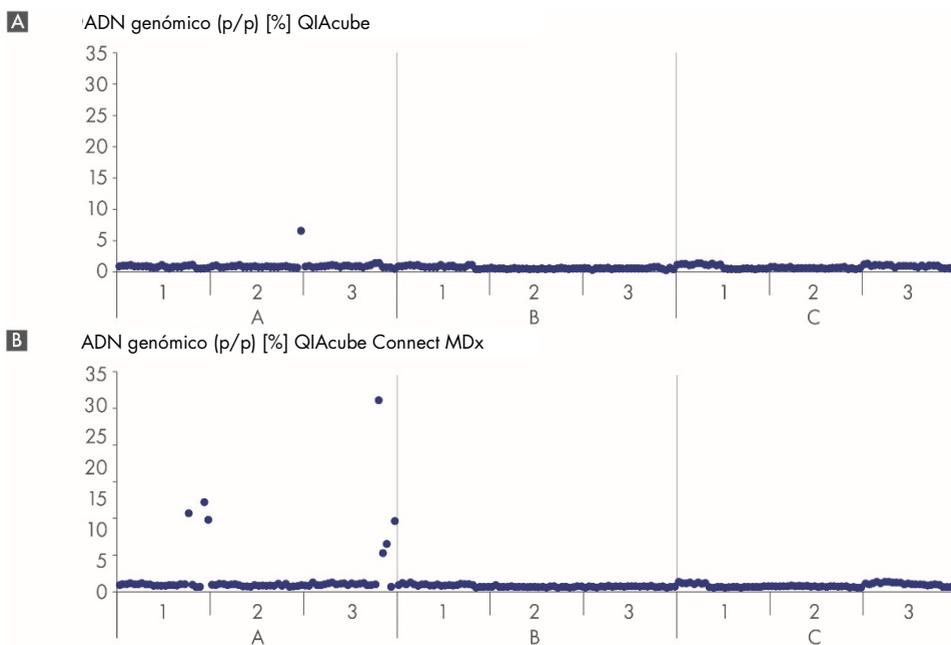
\* Tempo de teste do protocolo total, incluindo manipulação adiandada dos PAXgene Blood RNA Tubes (centrifugações, lavagem do pellet e ressuspensão do pellet).



**Figura 12. Rendimento de ARN – processamento automatizado: A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** As amostras de sangue de doadores individuais foram colhidas em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). O conteúdo dos tubos foi agrupado em 6 pools de doadores e novamente dividido. Foi processado um total de 216 tubos (ou seja, 36 por pool) por 3 técnicos diferentes (A, B, C). Cada técnico utilizou 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit para a extração automatizada com vários instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx e processou amostras quadruplicadas de cada um dos 6 pools de doadores. Mostram-se os rendimentos de ARN de todas as amostras individuais para cada combinação técnico-lote.

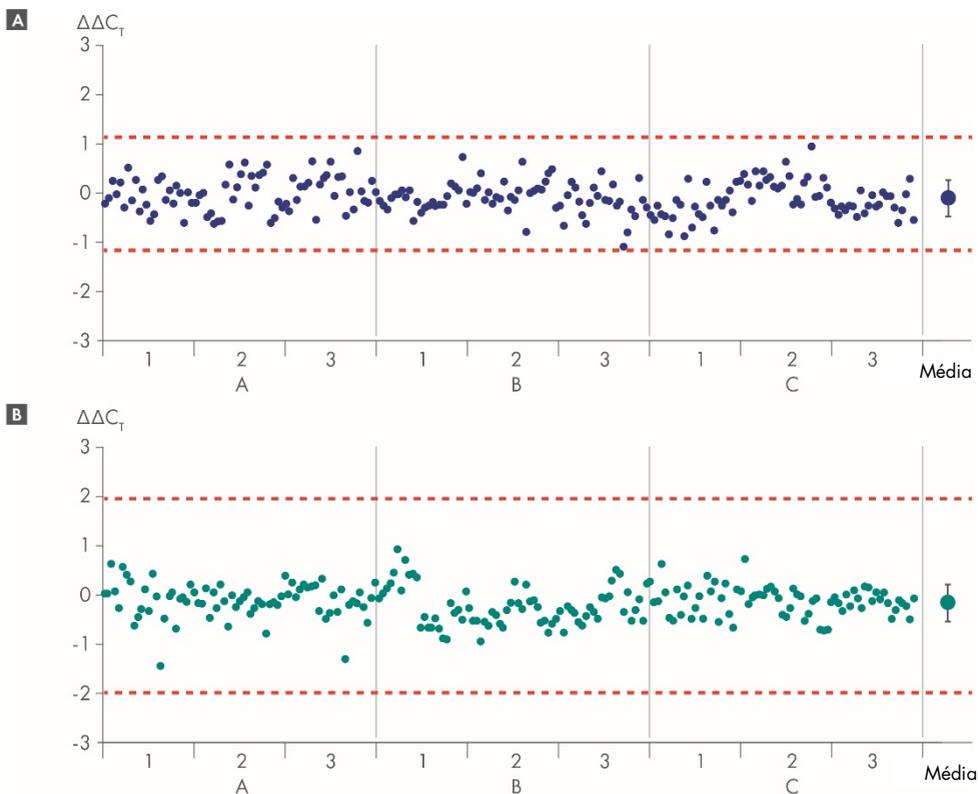


**Figura 13. Pureza do ARN (valores de  $A_{260}/A_{280}$ ) – processamento automatizado. A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx**  
 O ARN foi purificado por 3 técnicos diferentes (A, B, C) utilizando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com vários instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx na experiência descrita na Figura 12. Mostram-se os valores de  $A_{260}/A_{280}$  de todas as amostras individuais para cada combinação técnico-lote.

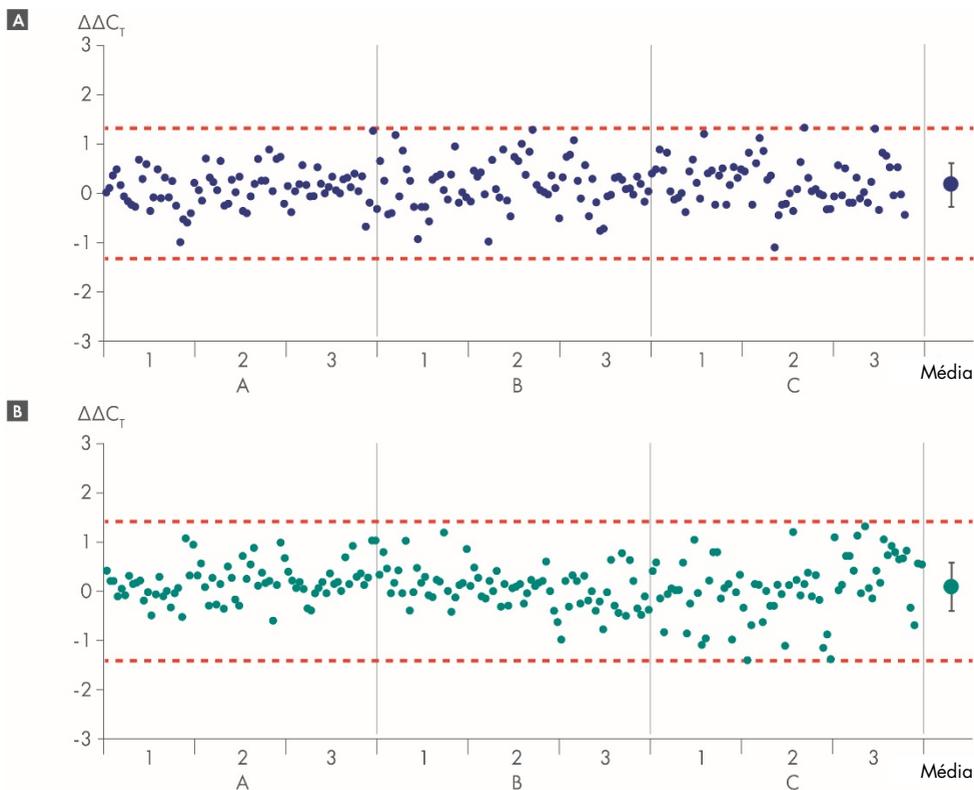


**Figura 14. Pureza do ARN (% de contaminação do ADN genómico) – processamento automatizado, A: QIAcube, B: QIAcube Connect MDx.** O ARN foi purificado por 3 técnicos diferentes (A, B, C) utilizando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com vários instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx na experiência descrita na Figura 12. Mostram-se os valores de ADN genómico (p/p) em todas as amostras individuais para cada combinação técnico-lote.

O protocolo automatizado de purificação de ARN utilizando o PAXgene Blood RNA System produz resultados de RT-PCR altamente reprodutíveis e repetíveis, conforme demonstrado na Figura 15 e na Figura 16, (páginas 37 e 38), tornando-o altamente robusto para testes de diagnóstico clínico.



**Figura 15. Reprodutibilidade da RT-PCR – entre os protocolos automatizados (QIAcube) e manuais.** O ARN foi purificado por 3 técnicos diferentes (A, B, C) utilizando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com vários instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx utilizando o protocolo automatizado na experiência descrita na Figura 12. Em paralelo, o ARN foi purificado a partir dos tubos de replicações correspondentes utilizando o protocolo manual. Os níveis de transcrição relativos do **[A]** FOS e **[B]** IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. As possíveis diferenças dos níveis de transcrição entre o ARN preparado a partir das amostras de sangue emparelhadas utilizando os dois protocolos de extração (protocolo automatizado e manual) foram calculadas pelo método  $\Delta\Delta C_T$ . Os valores individuais  $\Delta\Delta C_T$  de todos os pares de amostras (4 replicações x 6 pools de doadores x 3 lotes de kits x 3 técnicos = 216 pares para cada gene) são traçados como pontos únicos com valores médios (pontos maiores) e desvios-padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3x$  dos ensaios (FOS: 1,16  $C_T$ ; IL1B: 1,98  $C_T$ ; diferentes precisões de ensaio conforme comparado com as Figuras 1–4, 8 e 9 devido a diferentes versões do ensaio).



**Figura 16. Reprodutibilidade de RT-PCR – entre o QIAcube e o QIAcube Connect MDx utilizando o protocolo automatizado.** O ARN foi purificado por 3 técnicos diferentes (A, B, C) utilizando 3 lotes diferentes (1, 2, 3) do PAXgene Blood RNA Kit com o protocolo automatizado em vários instrumentos QIAcube e QIAcube Connect MDx na experiência descrita na Figura 12. Os níveis de transcrição relativos do [A] FOS e [B] IL1B foram determinados utilizando RT-PCR duplex em tempo real, com 18S ARNr como padrão interno. As possíveis diferenças dos níveis de transcrição entre o ARN preparado a partir das amostras de sangue emparelhadas utilizando os dois instrumentos foram calculadas pelo método  $\Delta\Delta C_T$ . Os valores individuais  $\Delta\Delta C_T$  de todos os pares de amostras (4 replicações x 6 pools de doadores x 3 lotes de kits x 3 técnicos = 216 pares para cada gene) são traçados como pontos únicos com valores médios (pontos maiores) e desvios-padrão (barras pretas) para todas as amostras apresentadas. As linhas a tracejado indicam a precisão total  $\pm 3x$  dos ensaios (FOS: 1,30  $C_T$ ; IL1B: 1,42  $C_T$ ; diferentes precisões de ensaio conforme comparado com as Figuras 1–4, 8, 9 e 15 devido a diferentes versões do ensaio).

# Equipamento e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador

Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

## Para todos os protocolos

- PAXgene Blood RNA Tubes (BRT, PreAnalytiX; n.º de cat. 762165)
- Etanol (96–100%, grau de pureza p.a.)
- Pipetas\* (10 µl–4 ml)
- Pontas de pipeta isentas de RNase, estéreis e com barreira para aerossóis†
- Proveta graduada‡
- Centrífuga\* capaz de atingir 3000–5000 x g, e equipada com um rotor de balanço exterior e suportes para PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)
- Agitador de vórtex\*
- Gelo picado
- Caneta permanente para rotular

\* Assegure-se de que os dispositivos e os instrumentos foram objeto de verificação, manutenção e calibração regulares, de acordo com as recomendações do fabricante.

† Assegure-se de que está familiarizado com as normas sobre a manipulação do ARN (Apêndice A, página 71).

‡ Para a adição de etanol ao concentrado de tampão BR4.

## Para o protocolo manual

- Microcentrífuga de velocidade variável\* capaz de atingir um intervalo de pelo menos 1000–8000 x *g*, apesar de forças *g* inferiores e superiores serem aplicáveis (consulte os passos do protocolo para obter detalhes) e equipadas com um rotor para tubos de microcentrifugação de 2 ml
- Incubador-agitador\* capaz de incubar a 55 °C e 65 °C e agitar a  $\geq 400$  rpm, não ultrapassando 1400 rpm (por exemplo, Eppendorf® Thermomixer Compact ou equivalente)

## Para o protocolo automatizado (utilizando o QIAcube ou o QIAcube Connect MDx)

- Tesoura

Consumíveis de instrumentos QIAcube:

- Filter-Tips, 1000  $\mu$ l (1024) (QIAGEN, n.º de cat. 990352)†
- Reagent Bottles, 30 ml (6) (QIAGEN, n.º de cat. 990393)†
- Rotor Adapters (10 x 24) (QIAGEN, n.º de cat. 990394)†

Acessórios de instrumentos QIAcube:

- Rotor Adapter Holder (QIAGEN, n.º de cat. 990392)†

## Para o protocolo automatizado utilizando o QIAcube Connect MDx

- QIAcube Connect MDx (QIAGEN, n.º de cat. 9003070)

\* Assegure-se de que os dispositivos e os instrumentos foram objeto de verificação, manutenção e calibração regulares, de acordo com as recomendações do fabricante.

† Também incluídos no Starter Pack, QIAcube (QIAGEN, n.º de cat. 990395).

Pacotes de serviços QIAcube Connect MDx:

- QIAcube Connect MDx System FUL-2 (QIAGEN, n.º de cat. 9003071)
- QIAcube Connect MDx System FUL-3 (QIAGEN, n.º de cat. 9003072)
- QIAcube Connect MDx System PRV-1 (QIAGEN, n.º de cat. 9003073)
- QIAcube Connect MDx Device PRV-1 (QIAGEN, n.º de cat. 9003074)
- QIAcube Connect MDx System PRM-1 (QIAGEN, n.º de cat. 9003075)

### **Para o protocolo automatizado utilizando o QIAcube**

- QIAcube \* (QIAGEN, n.º de cat. 9001882 [110 V])

\* Assegure-se de que os dispositivos e os instrumentos foram objeto de verificação, manutenção e calibração regulares, de acordo com as recomendações do fabricante.

# Notas importantes

## Utilizar instrumentos QIAcube

Assegure-se de que está familiarizado com o funcionamento do instrumento QIAcube. Leia o Manual do utilizador do instrumento QIAcube apropriado e todas as informações adicionais fornecidas com o instrumento QIAcube, prestando especial atenção às informações de segurança, antes de dar início aos protocolos automatizados do PAXgene Blood RNA.

As instruções nesta secção aplicam-se ao QIAcube Connect MDx assim como ao QIAcube, quando não especificado separadamente.

### Iniciar os instrumentos QIAcube

Feche a cobertura do instrumento QIAcube e desligue o instrumento QIAcube no interruptor de alimentação (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: Figura 18, página 44).

Ouve-se um sinal sonoro e aparece o ecrã de arranque. O instrumento efetua automaticamente testes de inicialização.



Vista frontal do QIAcube Connect MDx



Ecrã tátil extraído



Vista traseira do QIAcube Connect MDx



Vista traseira do QIAcube Connect MDx

Figura 17. Características externas do QIAcube Connect MDx.

- |  |   |
|--|---|
| <p>1 Ecrã tátil</p> <p>2 Cobertura</p> <p>3 Gaveta de resíduos</p> <p>4 Interruptor de alimentação</p> | <p>5 2 portas USB no lado esquerdo do ecrã tátil; 2 portas USB atrás do ecrã tátil (módulo Wi-Fi ligado a 1 porta USB)</p> <p>6 Porta Ethernet RJ-45</p> <p>7 Tomada do cabo de alimentação</p> <p>8 Saída de ar de arrefecimento</p> |
|--|---|



**Figura 18. Vista frontal do QIAcube.**

- |   |   |   |                                    |
|---|---|---|------------------------------------|
| ① | Ecrã tátil  | ④ | Porta USB atrás do painel protetor |
| ② | Cobertura   | ⑤ | Interruptor de alimentação         |
| ③ | Porta série RS232 atrás do painel protetor<br>(para utilização exclusiva por especialistas em<br>assistência técnica do instrumento QIAGEN) | ⑥ | Gaveta de resíduos                 |

## Ecrã tátil

Os instrumentos QIAcube são controlados com um ecrã tátil. O ecrã tátil permite ao utilizador operar o instrumento e orientar os utilizadores através da configuração da mesa de trabalho. Durante o processamento de amostras, o ecrã tátil mostra o estado do protocolo e o tempo restante.



Figura 19. Ecrã tátil extraído do QIAcube Connect MDx

## Instalar protocolos nos instrumentos QIAcube

Pode ser necessária uma instalação de protocolos inicial antes que se possa efetuar a primeira preparação de ARN nos instrumentos QIAcube. Instale os protocolos "PAXgene Blood RNA Part A" e "PAXgene Blood RNA Part B".

Os protocolos para o QIAcube Connect MDx são fornecidos em **[www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources](http://www.qiagen.com/products/diagnostics-and-clinical-research/solutions-for-laboratory-developed-tests/qiacube-connect-mdx/#resources)** ([www.qiagen.com/MyQIAcube](http://www.qiagen.com/MyQIAcube) para o QIAcube) e têm de ser transferidos para a pen USB fornecida com os instrumentos QIAcube. Estes protocolos serão transferidos para o instrumento através da porta USB.

A porta USB (QIAcube Connect MDx: localizada no lado do ecrã tátil, consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: atrás do painel protetor, consulte a Figura 18, página 44) permite a ligação dos instrumentos QIAcube à pen USB fornecida com os instrumentos QIAcube. Os ficheiros de dados, tais como ficheiros de registo ou ficheiros de relatório, também podem ser transferidos pela porta USB dos instrumentos QIAcube para a pen USB.



A porta USB destina-se apenas a ser utilizada com a pen USB fornecida pela QIAGEN. Não ligue outros dispositivos a esta porta.



Não retire a pen USB enquanto estiverem a ser descarregados protocolos ou transferidos ficheiros de dados, nem durante um ensaio de protocolo.

Para obter mais detalhes sobre o processo de carregamento de protocolos em instrumentos QIAcube, consulte o manual relacionado para o instrumento utilizado.

## Carregar os instrumentos QIAcube

Para poupar tempo, o carregamento pode ser efetuado durante um ou ambos os passos de centrifugação de 10 minutos (passos 3 e 5) em "Protocolo: Purificação automatizada do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)", página 66.

### Frascos de reagente

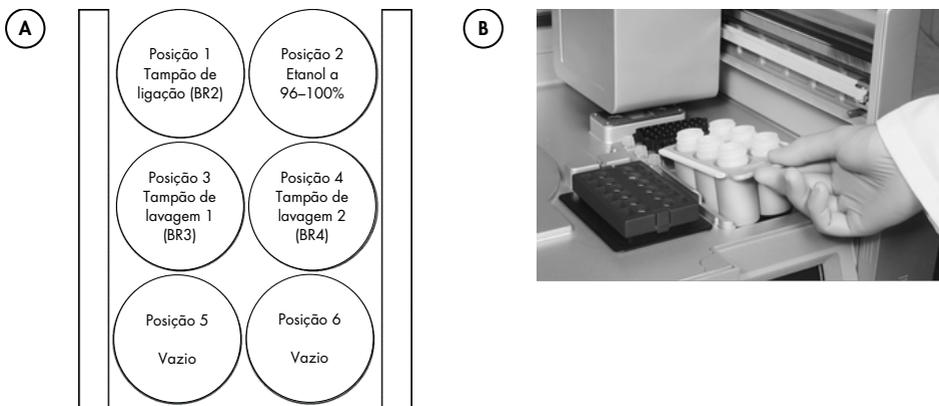
Antes de cada ensaio no instrumento QIAcube, encha cuidadosamente os 4 frascos de reagente com os reagentes listados na Tabela 3 (página 47) até ao nível máximo do indicador ou, se isso não for possível, até ao nível permitido pelos volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule claramente os frascos e as tampas com os nomes de tampão e coloque os frascos de reagente cheios nas posições adequadas no respetivo suporte. Carregue o suporte na mesa de trabalho do instrumento QIAcube conforme demonstrado (Figuras 20 e 22, páginas 48–50).

-  O volume de tampão BR2 fornecido não irá encher o frasco de reagente até ao nível do indicador. Os tampões BR3 e BR4 não irão encher o frasco até ao nível do indicador após o processamento de várias amostras nos ensaios anteriores.
-  Certifique-se de que retira as tampas dos frascos antes de os colocar na mesa de trabalho.
-  Os volumes de tampão fornecidos no PAXgene Blood RNA Kit (50) são suficientes para um máximo de 7 ensaios de preparação de ARN no instrumento QIAcube e cada ensaio pode ter entre 2 a 12 amostras. Em geral, os ensaios com números de amostra inferiores devem ser evitados para processar um total de 50 amostras por kit com um máximo de 7 ensaios de preparação de ARN. Mais de 7 ensaios de preparação de ARN podem originar volumes de tampão insuficientes para o processamento das últimas amostras.

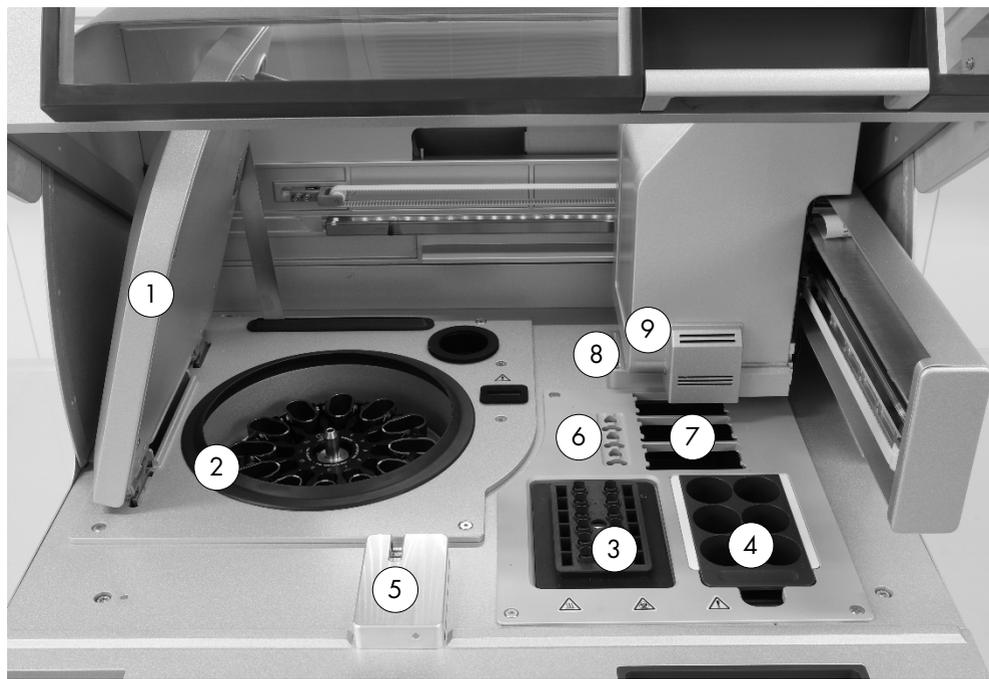
**Tabela 3. Posições no suporte de frascos de reagente**

| Posição | Reagente                   |
|---------|----------------------------|
| 1       | Tampão de ligação (BR2)    |
| 2       | Etanol a 96–100%           |
| 3       | Tampão de lavagem 1 (BR3)  |
| 4       | Tampão de lavagem 2 (BR4)* |
| 5       | – (deixar vazio)           |
| 6       | – (deixar vazio)           |

\*O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.

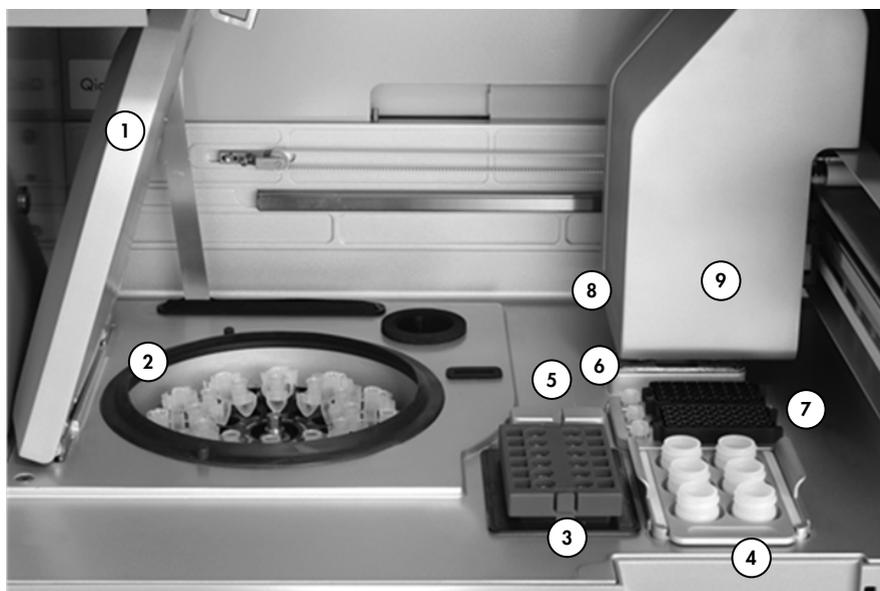


**Figura 20. Carregar o suporte de frascos de reagente.** [A] Posições esquemáticas e conteúdo dos frascos no suporte de frascos de reagente. [B] Carregar o suporte no instrumento QIAcube (QIAcube mostrado a título de exemplo).



**Figura 21. Vista interna do QIAcube Connect MDx.**

- |   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| 1 | Tampa da centrífuga                      | 6 | Ranhas para tubos de microcentrifugação   |
| 2 | Centrífuga                               | 7 | 3 ranhas para suportes de pontas  |
| 3 | Agitador                                 | 8 | Ranhas de eliminação para pontas e colunas  |
| 4 | Suporte do frasco de reagente            | 9 | Braço robótico (inclui 1 pipetador de canal, garra, sensor ótico e ultrassónico e LED UV) |
| 5 | Sensor de pontas e bloqueio da cobertura |   |   |



**Figura 22. Vista interna do QIAcube.**

- |   |  |
|---|--|
| <p>1 Tampa da centrífuga</p> <p>2 Centrífuga</p> <p>3 Agitador</p> <p>4 Suporte do frasco de reagente</p> <p>5 Sensor de pontas</p> | <p>6 Ranhuras para tubos de microcentrifugação</p> <p>7 Suportes de pontas</p> <p>8 Ranhuras de eliminação para pontas e colunas</p> <p>9 Braço robótico</p> |
|---|--|

Colunas de rotação (PRC, PSC), tubos de microcentrifugação (MCT) e material de plástico dos instrumentos QIAcube

Coloque 2 suportes de pontas cheios com Filter-Tips de 1000 µl no instrumento QIAcube (consulte as Figuras 21 e 22, páginas 49 e 50). Volte a encher os suportes com pontas quando for necessário.

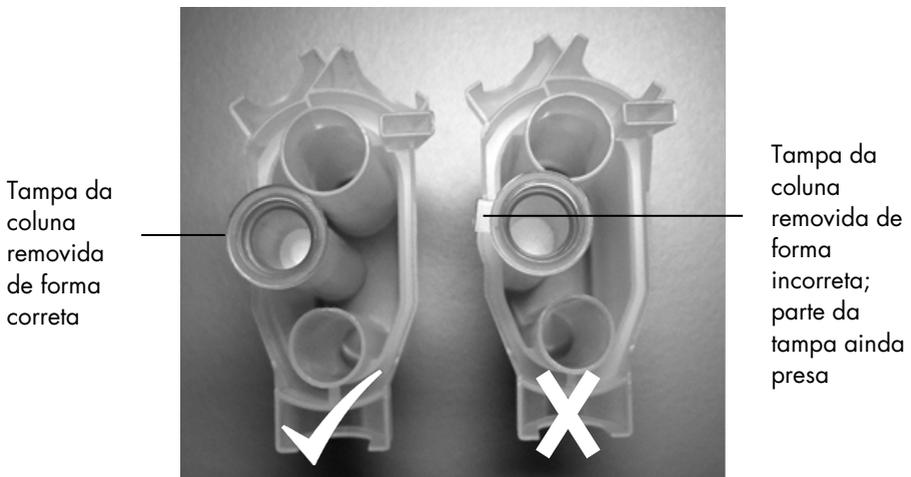


Utilize apenas pontas com filtro de 1000 µl concebidas para utilização com instrumentos QIAcube.

Rotule os adaptadores do rotor e os tubos de microcentrifugação (MCT) para cada amostra utilizando uma caneta de tinta permanente. Abra as colunas de rotação PAXgene Shredder (PSC) a utilizar e corte totalmente as tampas utilizando uma tesoura (consulte a Figura 23, página 52).



Para um funcionamento adequado da garra robótica dos instrumentos QIAcube, retire completamente (corte) as tampas e todas as peças de plástico que ligam a tampa às colunas de rotação PAXgene Shredder (PSC; consulte a Figura 23). Caso contrário, a garra robótica não poderá agarrar as colunas de rotação (PSC, PRC) corretamente.



**Figura 23. Carregar uma coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC).** A coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC) é carregada na posição central do adaptador do rotor. Corte a tampa antes de carregar a coluna.

Carregue a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC), a coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC, sem tampa, consulte a Figura 23, página 52) e o tubo de microcentrifugação rotulado nas posições adequadas em cada adaptador do rotor rotulado, conforme demonstrado na Tabela 4 e na Figura 24.

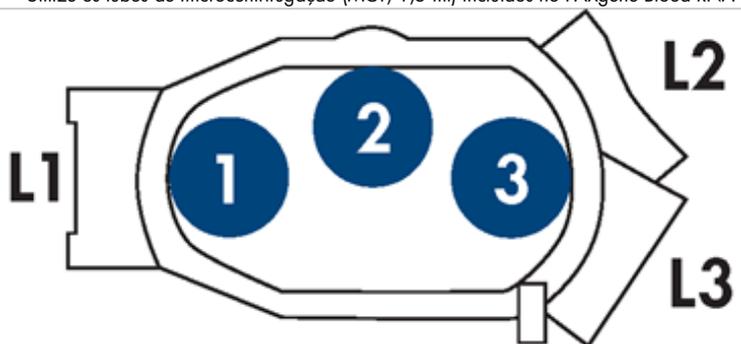


Certifique-se de que as tampas da coluna de rotação (PRC) e os tubos de microcentrifugação (MCT) são totalmente empurradas para baixo até à base das ranhuras na extremidade do adaptador do rotor. Caso contrário, as tampas irão partir-se durante a centrifugação.

**Tabela 4. Material de laboratório no adaptador do rotor**

| Posição | Reagente   | Posição da tampa |
|---------|--|------------------|
| 1       | Coluna de rotação PAXgene RNA (vermelha, PRC)  | L1               |
| 2       | Coluna de rotação PAXgene Shredder (lilás, PSC)<br>(cortar a tampa antes de colocar no adaptador do rotor) | -                |
| 3       | Tubo de microcentrifugação (MCT)*  | L3               |

\* Utilize os tubos de microcentrifugação (MCT; 1,5 ml) incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.



**Figura 24. Posições no adaptador do rotor.** O adaptador do rotor apresenta três posições de tubo (1-3) e três posições de tampa (L1-L3).

## Carregar a centrífuga

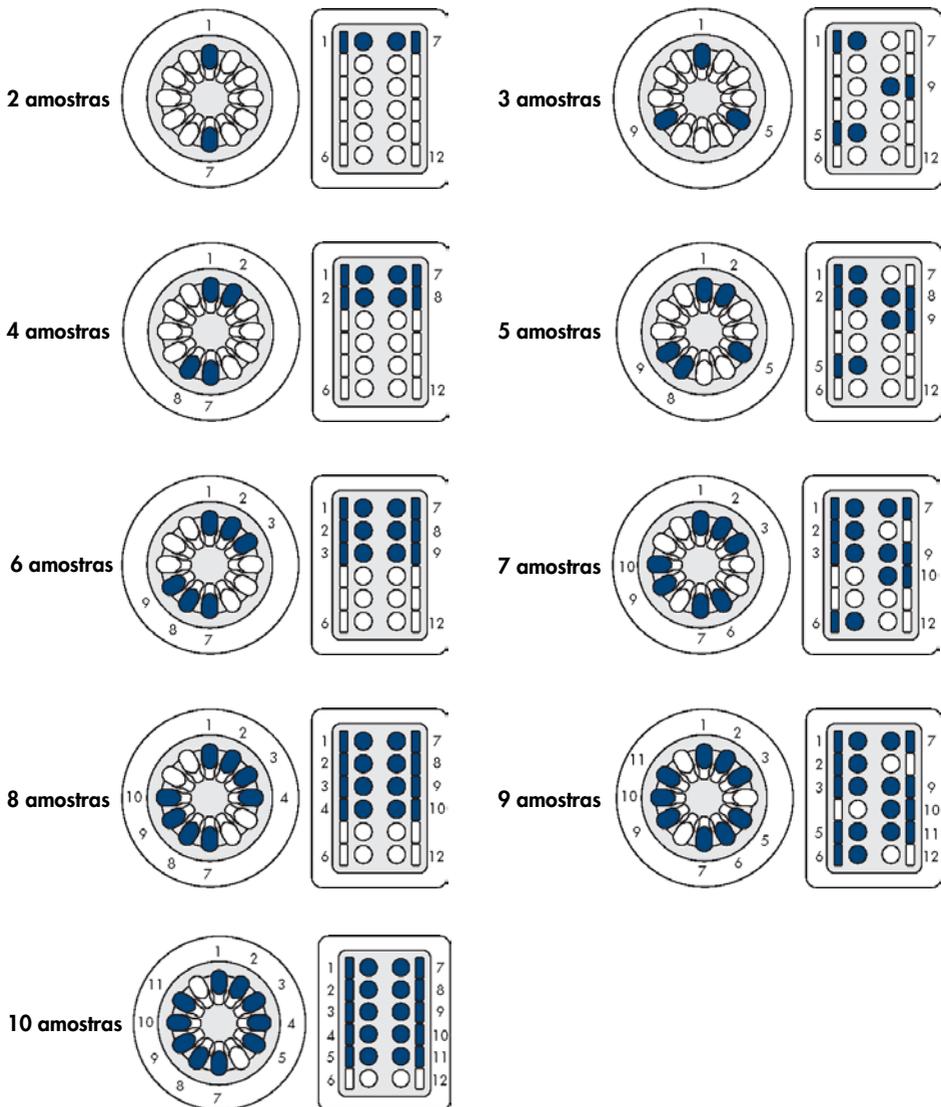
Carregue os adaptadores do rotor montados nos baldes da centrífuga conforme demonstrado na Figura 25 abaixo.



Se forem processadas menos de 12 amostras, certifique-se de que carrega o rotor da centrífuga equilibrado radialmente (consulte a Figura 26, página 55). Todos os baldes da centrífuga devem ser montados antes de se iniciar um ensaio do protocolo, mesmo que se pretendam processar menos de 12 amostras. Não é possível processar uma única amostra ou 11 amostras.



**Figura 25. Carregar a centrífuga nos instrumentos QIAcube.** Carregue os adaptadores do rotor montados nos baldes da centrífuga (QIAcube Connect MDx mostrado a título de exemplo).



**Figura 26. Carregar a centrífuga e o agitador.** Mostram-se as posições da centrífuga e do agitador para processamento de duas (2) a dez (10) amostras. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Para processar 12 amostras, todas as posições da centrífuga e do agitador são carregadas (imagem não apresentada).

## Tubos de processamento (PT)

Retire os tubos de processamento (PT) deixados nas ranhuras para tubos de microcentrifugação em ensaios anteriores (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 49, QIAcube: consulte a Figura 22, página 50). Encha 3 tubos de processamento (PT) com a quantidade de reagentes indicada na Tabela 5, de acordo com o número de amostras do ensaio.

Para a mistura de incubação de DNase I, pipete o volume de tampão de digestão de ADN indicado (RDD) num tubo de processamento (PT) e adicione o volume indicado de solução-mãe de DNase I (RNFD). Misture, pipetando suavemente a mistura completa para cima e para baixo 3 vezes, utilizando uma ponta de pipeta de 1000 µl.

Utilize os tubos de processamento (PT) de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit. Rotule claramente os tubos com os nomes dos reagentes e coloque-os na posição adequada nas ranhuras para tubos de microcentrifugação, conforme indicado na Tabela 6 (página 57).



A DNase I (RNFD) é especialmente sensível à desnaturação física. Misture, pipetando apenas, e utilizando pontas de pipetas de diâmetro amplo para reduzir a deformação. Não agite no vórtex.



Certifique-se de que é pipetado apenas o volume necessário, conforme indicado na Tabela 5.

**Tabela 5. Volume de reagentes necessário nos tubos de processamento para as ranhuras de tubos de microcentrifugação.**

| Número de amostras | Volume de reagente para o número indicado de amostras (µl) |                                    |                         |
|--------------------|--|------------------------------------|-------------------------|
|                    | Proteinase K (PK)  | Mistura de incubação de DNase I    | Tampão de eluição (BR5) |
| 2                  | 126  | 187 (23 DNase I + 164 Buffer RDD)  | 313                     |
| 3                  | 170  | 261 (33 DNase I + 228 Buffer RDD)  | 399                     |
| 4                  | 213  | 334 (42 DNase I + 292 Buffer RDD)  | 486                     |
| 5                  | 256  | 407 (51 DNase I + 356 Buffer RDD)  | 572                     |
| 6                  | 299  | 481 (60 DNase I + 421 Buffer RDD)  | 658                     |
| 7                  | 342  | 554 (69 DNase I + 485 Buffer RDD)  | 745                     |
| 8                  | 386  | 627 (78 DNase I + 549 Buffer RDD)  | 831                     |
| 9                  | 429  | 701 (88 DNase I + 613 Buffer RDD)  | 918                     |
| 10                 | 472  | 775 (97 DNase I + 678 Buffer RDD)  | 1004                    |
| 12                 | 558  | 921 (115 DNase I + 806 Buffer RDD) | 1177                    |

**Tabela 6. Ranhuras para tubos de microcentrifugação**

|                   | Posição                     |                                 |                             |
|-------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
|                   | A                           | B                               | C                           |
| <b>Conteúdo</b>   | Proteinase K                | Mistura de incubação de DNase I | Tampão de eluição (BR5)     |
| <b>Recipiente</b> | Tubo de processamento (PT)* | Tubo de processamento (PT)*     | Tubo de processamento (PT)* |

\* Utilize os tubos de processamento de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

# Protocolo: Purificação manual do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que a caixa do kit está intacta e não se apresenta danificada e que os tampões não apresentam fugas. Não utilize um kit que esteja danificado.
- Durante a utilização de uma pipeta, certifique-se de que está definida para o volume correto e que o líquido é cuidadosa e totalmente aspirado e dispensado.
- Para evitar transferir amostras para o tubo ou coluna de rotação errados, assegure-se de que todos os tubos e colunas de rotação são corretamente rotulados com uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de cada tubo (PT, MCT). Para as colunas de rotação, rotule o corpo do respetivo tubo de processamento (PT). Feche todos os tubos ou colunas de rotação depois de ter sido transferido líquido.
- Derrames acidentais de amostras e tampões durante o procedimento podem reduzir o rendimento e a pureza do ARN.
- Salvo indicação em contrário, todos os passos deste protocolo, incluindo os passos de centrifugação, devem ser efetuados à temperatura ambiente (15–25 °C).

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as seguintes precauções indicadas são necessárias quando se manipulam amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra para a coluna de rotação (PRC, PSC) sem humedecer a borda da coluna.
- Troque sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Use pontas de pipeta com proteção contra aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de rotação (PRC, PSC) com a ponta da pipeta.
- Depois de agitar um tubo de microcentrifugação (MCT) no vórtex ou depois de o aquecer, centrifugue-o durante breves instantes para eliminar gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contacto entre as luvas e a amostra, troque imediatamente de luvas.
- Feche a coluna de rotação (PRC, PSC) antes de a colocar na microcentrífuga. Centrifugue conforme descrito no procedimento.
- Abra apenas uma coluna de rotação (PRC, PSC) de cada vez e tenha cuidado para evitar a formação de aerossóis.
- Para um processamento eficiente de amostras múltiplas em paralelo, encha um suporte com tubos de processamento (PT) para os quais as colunas de rotação (PRC, PSC) possam ser transferidas depois da centrifugação. Elimine os tubos de processamento (PT) usados que contêm o produto residual e coloque os novos tubos de processamento (PT) que contêm as colunas de rotação (PRC, PSC) diretamente na microcentrífuga.

### Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- O sangue deve ser colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*. Se for necessário, consulte o Apêndice C (página 80) para obter recomendações sobre a manipulação de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) são incubados durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente depois da colheita de sangue, para garantir a lise completa das células sanguíneas. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) de um dia para o outro pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, –20 °C ou –70 °C depois da colheita de sangue, equilibre-o primeiro até à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente durante 2 horas antes de iniciar o procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 10.
- Leia também as normas sobre a manipulação do ARN (Apêndice A, página 77).

- Assegure-se de que os instrumentos, como pipetas e incubador-agitador, foram verificados e calibrados regularmente, de acordo com as recomendações do fabricante.
- Para os passos 5 e 20, é necessário um incubador-agitador. Ajuste a temperatura do incubador-agitador para 55 °C.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se for necessário, aqueça a 37 °C para dissolvê-lo.
- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione 4 volumes de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver a utilizar o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare uma solução-mãe de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades de Kunitz) \* em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tenha cuidado para não perder DNase I (RNFD) ao abrir o frasco. Não agite a DNase I reconstituída (RNFD) no vórtex. A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser efetuada apenas invertendo suavemente o frasco.
- Os dados atuais mostram que a DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Para armazenamento da DNase I (RNFD) a longo prazo, retire a solução-mãe do frasco de vidro, divida-a em alíquotas para uma única utilização (use os tubos de microcentrifugação [MCT] de 1,5 ml fornecidos com o kit; existe uma quantidade suficiente para 5 alíquotas) e armazene-os a –20 °C durante um período máximo de 9 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Não volte a congelar as alíquotas depois do seu descongelamento.
- Durante a reconstituição e criação de alíquotas de DNase I (RNFD), certifique-se de que as normas sobre a manipulação de ARN são cumpridas (Apêndice A, página 77).

\* As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente utilizadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento de  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) J. Gen. Physiol. **33**, 349 e 363).

## Procedimento

1. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos com base redonda. Se forem usados outros tipos de adaptadores de tubo, os tubos podem partir-se durante a centrifugação.

2. Retire o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 ml de RNase-Free Water (RNF<sub>W</sub>) ao pellet e feche o tubo utilizando uma nova tampa secundária BD Hemogard (fornecida com o kit).

Se o sobrenadante for decantado, tenha cuidado para não interferir com o pellet e seque a borda do tubo com um toalhete de papel limpo.

3. Agite no vórtex até à dissolução visível do pellet e centrifugue durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior. Retire e elimine todo o sobrenadante.

Pequenos detritos que permaneçam no sobrenadante após a agitação no vórtex, mas antes da centrifugação não irão afetar o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante irá inibir a lise e diluir o lisado e, consequentemente, afetar as condições para ligação do ARN à membrana do PAXgene.

4. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite no vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.
5. Pipete a amostra para um tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml. Adicione 300 µl de tampão de ligação (BR2) e 40 µl de proteinase K (PK). Misture, agitando no vórtex durante 5 segundos, e incube durante 10 minutos a 55 °C utilizando um incubador-agitador a 400–1400 rpm. Depois da incubação, ajuste a temperatura do incubador-agitador para 65 °C (para o passo 20).



Não misture o tampão de ligação (BR2) e a proteinase K (PK) antes de os adicionar à amostra.

- Pipete o lisado diretamente para uma coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC; lilás) colocada num tubo de processamento (PT) de 2 ml e centrifugue durante 3 minutos à velocidade máxima (mas não excedendo 20 000 x g).



Pipete cuidadosamente o lisado para a coluna de rotação (PSC) e verifique visualmente se foi totalmente transferido.

Para evitar danos nas colunas (PSC) e nos tubos (PT), não exceda 20 000 x g.



Algumas amostras podem fluir pela coluna de rotação PAXgene Shredder (PSC) sem centrifugação. Tal deve-se à baixa viscosidade de algumas amostras e não deve ser considerado como indicação de falha do produto.

- Transfira cuidadosamente a totalidade do sobrenadante da fração do produto residual para um tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml novo sem interferir com o pellet no tubo de processamento.
- Adicione 350 µl de etanol (96-100%, grau de pureza p.a.). Misture, agitando no vórtex e centrifugue durante breves instantes (1–2 segundos a 500–1000 x g) para eliminar gotas do interior da tampa do tubo.



A duração da centrifugação não deve exceder 1–2 segundos, dado que tal pode resultar na formação de pellets de ácidos nucleicos e na redução do rendimento do ARN total.

- Pipete 700 µl de amostra para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC; vermelho) colocada num tubo de processamento (PT) de 2 ml e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.
- Pipete a amostra restante para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.



Pipete cuidadosamente a amostra para a coluna de rotação (PRC) e verifique visualmente se a amostra foi totalmente transferida.

11. Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.
12. Adicione 10 µl de solução-mãe de DNase I (RNFD) a 70 µl de tampão de digestão de ADN (RDD) num tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml. Misture, agitando suavemente o tubo e centrifugue durante breves instantes para recolher líquido residual dos lados do tubo. Se estiverem a ser processadas, por exemplo, 10 amostras, adicione 100 µl de solução-mãe de DNase I (RNFD) a 700 µl de tampão de digestão de ADN (RDD). Use os tubos de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml fornecidos com o kit.



A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura apenas deve ser efetuada agitando suavemente o tubo. Não agite no vórtex.

13. Pipete a mistura de incubação de DNase I (RNFD) (80 µl) diretamente para a membrana da coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e coloque na bancada (20–30 °C) durante 15 minutos.



Certifique-se de que a mistura de incubação de DNase I (RNFD) é colocada diretamente na membrana. A digestão da DNase poderá ser incompleta se parte da mistura for aplicada e permanecer nas paredes ou na anilha da coluna de rotação (PRC).

14. Pipete 350 µl de tampão de lavagem 1 (BR3) para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.
15. Pipete 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) e centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g. Coloque a coluna de rotação (PRC) num tubo de processamento (PT) de 2 ml novo e elimine o tubo de processamento (PT) antigo que contém produto residual.



O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Assegure-se de que adiciona etanol ao tampão de lavagem 2 (BR4) antes da utilização (consulte "Passos a seguir antes de iniciar o procedimento", página 59).

16. Adicione mais 500 µl de tampão de lavagem 2 (BR4) à coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 3 minutos a 8000–20 000 x g.
17. Elimine o tubo de processamento (PT) que contém o produto residual e coloque a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) num novo tubo de processamento (PT) de 2 ml. Centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g.
18. Elimine o tubo de processamento (PT) que contém o produto residual. Coloque a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) num tubo de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml e pipete 40 µl de tampão de eluição (BR5) diretamente para a membrana da coluna de rotação PAXgene RNA (PRC). Centrifugue durante 1 minuto a 8000–20 000 x g para eluir o ARN.  

É importante molhar a totalidade da membrana com tampão de eluição (BR5) para obter a máxima eficiência de eluição.
19. Repita o passo de eluição (passo 18) conforme descrito, usando 40 µl de tampão de eluição (BR5) e o mesmo tubo de microcentrifugação (MCT).
20. Incube o eluato durante 5 minutos a 65 °C no incubador-agitador (do passo 5) sem agitar. Depois da incubação, arrefeça imediatamente em gelo.  

Esta incubação a 65 °C desnatura o ARN para aplicações a jusante. Não ultrapasse o tempo nem a temperatura de incubação.
21. Caso não utilize as amostras de ARN de imediato, armazene a –20 °C ou –70 °C.  

Dado que o ARN se mantém desnaturado após ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, não é necessário repetir a incubação a 65 °C. Se as amostras de ARN forem utilizadas num ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para quantificação exata do ARN por medição da absorvância a 260 nm, é recomendável diluir as amostras com 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5.\* A diluição da amostra com RNase-Free Water poderá resultar em valores muito baixos pouco fiáveis. Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.



Para quantificação em tampão Tris HCl, utilize a relação  $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Consulte o Apêndice B, página 78.

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

# Protocolo: Purificação automatizada do ARN total a partir de sangue total humano colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)

## Pontos importantes antes de começar

- Certifique-se de que a caixa do kit está intacta e não se apresenta danificada e que os tampões não apresentam fugas. Não utilize um kit que esteja danificado.
- Durante a utilização de uma pipeta, certifique-se de que está definida para o volume correto e que o líquido é cuidadosa e totalmente aspirado e dispensado.
- Para evitar transferir amostras para os tubos e consumíveis plásticos errados, assegure-se de que todos os tubos de processamento (PT), tubos de microcentrifugação (MCT) e adaptadores do rotor são corretamente rotulados com uma caneta permanente. Rotule a tampa e o corpo de todos os tubos de microcentrifugação (MCT), o corpo de todos os tubos de processamento (PT) e a parede exterior de todos os adaptadores do rotor.
- Derrames acidentais de amostras e tampões durante o procedimento podem reduzir o rendimento e a pureza do ARN.
- Salvo indicação em contrário, todos os passos deste protocolo, incluindo os passos de centrifugação, devem ser efetuados à temperatura ambiente (15–25 °C).

Dada a sensibilidade das tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos, as seguintes precauções indicadas são necessárias quando se manipulam amostras para evitar a contaminação cruzada:

- Pipete cuidadosamente a amostra na base do tubo de processamento (PT) sem humedecer a borda do tubo.
- Troque sempre as pontas das pipetas entre cada transferência de líquidos. Use pontas de pipeta com proteção contra aerossóis.

- Evite tocar na membrana da coluna de rotação (PRC, PSC) com a ponta da pipeta.
- Depois de agitar um tubo de microcentrifugação (MCT) no vórtex ou depois de o aquecer, centrifugue-o durante breves instantes para eliminar gotas do interior da tampa.
- Use luvas durante todo o procedimento. Em caso de contacto entre as luvas e a amostra, troque imediatamente de luvas.

### Passos a seguir antes de iniciar o procedimento

- O sangue deve ser colhido em PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) de acordo com as instruções do *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*. Se for necessário, consulte o Apêndice C (página 80) para obter recomendações sobre a manipulação de PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).
- Certifique-se de que os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT) são incubados durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente depois da colheita de sangue, para garantir a lise completa das células sanguíneas. A incubação do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) de um dia para o outro pode aumentar os rendimentos. Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) tiver sido armazenado a 2–8 °C, –20 °C ou –70 °C depois da colheita de sangue, equilibre-o primeiro até à temperatura ambiente e, em seguida, armazene-o à temperatura ambiente durante 2 horas antes de iniciar o procedimento.
- Leia as informações de segurança na página 10.
- Leia "Notas importantes", página 42.
- Leia também as normas sobre a manipulação do ARN (Apêndice A, página 77).
- Leia o Manual do utilizador do instrumento QIAcube apropriado e todas as informações adicionais fornecidas com o instrumento QIAcube, prestando especial atenção às informações de segurança.
- Assegure-se de que os dispositivos e instrumentos, como pipetas e instrumento QIAcube, foram verificados e calibrados regularmente, de acordo com as recomendações do fabricante.
- O tampão de ligação (BR2) pode formar um precipitado após o armazenamento. Se for necessário, aqueça a 37 °C para dissolvê-lo.

- O tampão de lavagem 2 (BR4) é fornecido na forma de concentrado. Antes da primeira utilização, adicione o volume apropriado de etanol (96 a 100%, grau de pureza p.a.) conforme indicado no frasco, para obter uma solução de trabalho.
- Se estiver a utilizar o RNase-Free DNase Set pela primeira vez, prepare uma solução-mãe de DNase I. Dissolva a DNase I sólida (RNFD; 1500 unidades de Kunitz)\* em 550 µl do tampão de ressuspensão de DNase (DRB) fornecido com o conjunto. Tenha cuidado para não perder DNase I (RNFD) ao abrir o frasco. Não agite a DNase I reconstituída (RNFD) no vórtex. A DNase I é especialmente sensível à desnaturação física. A mistura deve ser efetuada apenas invertendo suavemente o frasco.
- Os dados atuais mostram que a DNase I reconstituída (RNFD) pode ser armazenada a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Para armazenamento da DNase I (RNFD) a longo prazo, retire a solução-mãe do frasco de vidro, divida-a em alíquotas para uma única utilização (use os tubos de microcentrifugação [MCT] de 1,5 ml fornecidos com o kit; existe uma quantidade suficiente para 5 alíquotas) e armazene-os a –20 °C durante um período máximo de 9 meses. As alíquotas descongeladas podem ser armazenadas a 2–8 °C durante um período máximo de 6 semanas. Não volte a congelar as alíquotas depois do seu descongelamento.
- Durante a reconstituição e criação de alíquotas de DNase I (RNFD), certifique-se de que as normas sobre a manipulação de ARN são cumpridas (Apêndice A, página 77).
- Instale o adaptador do agitador correto (incluído com os instrumentos QIAcube; use o adaptador para tubos com fecho de segurança de 2 ml, marcado com "2") e coloque o suporte do agitador em cima do adaptador.
- Inspeccione a gaveta de resíduos e esvazie-a, se necessário.
- Instale quaisquer protocolos relacionados, se isso ainda não tiver sido feito para os ensaios anteriores. O QIAcube Connect MDx requer que todos os protocolos encontrados no ficheiro zip relacionado sejam descarregados. Para o QIAcube clássico, instale os protocolos "PAXgene Blood RNA Part A" e "PAXgene Blood RNA Part B". Consulte "Instalar protocolos nos instrumentos QIAcube", na página 45.

\* As unidades de Kunitz são as unidades habitualmente utilizadas para medir a DNase I, definidas como a quantidade de DNase I que provoca um aumento de  $A_{260}$  de 0,001 por minuto por mililitro a 25 °C, pH 5,0, com ADN altamente polimerizado como substrato (Kunitz, M. (1950) *J. Gen. Physiol.* **33**, 349 e 363).

## Procedimento

1. Feche a cobertura do instrumento QIAcube e desligue o instrumento QIAcube no interruptor de alimentação (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: consulte a Figura 18, página 44).

Ouve-se um sinal sonoro e aparece o ecrã de arranque. Os instrumentos efetuam automaticamente os testes de inicialização.

2. Abra a cobertura do instrumento QIAcube e carregue os reagentes e materiais de plástico necessários no instrumento QIAcube. Consulte "Carregar os instrumentos QIAcube", na página 46.

Para poupar tempo, o carregamento pode ser efetuado durante um ou ambos os passos de centrifugação de 10 minutos subsequentes (passos 3 e 5).

3. Centrifugue o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior.



Certifique-se de que a amostra de sangue foi incubada no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas à temperatura ambiente (15–25 °C) para obter a lise completa das células sanguíneas.



O rotor deve conter adaptadores de tubo para tubos com base redonda. Se forem usados outros tipos de adaptadores de tubo, os tubos podem partir-se durante a centrifugação.

4. Retire o sobrenadante por meio de decantação ou pipetagem. Adicione 4 ml de RNase-Free Water (RNFW) ao pellet e feche o tubo utilizando uma nova tampa secundária BD Hemogard (fornecida com o kit).

Se o sobrenadante for decantado, tenha cuidado para não interferir com o pellet e seque a borda do tubo com um toalhete de papel limpo.

5. Agite no vórtex até à dissolução visível do pellet e centrifugue durante 10 minutos a 3000–5000 x g usando um rotor de balanço exterior. Retire e elimine todo o sobrenadante.

Pequenos detritos que permaneçam no sobrenadante após a agitação no vórtex, mas antes da centrifugação não irão afetar o procedimento.



A remoção incompleta do sobrenadante irá inibir a lise e diluir o lisado e, consequentemente, afetar as condições para ligação do ARN à membrana do PAXgene.

6. Adicione 350 µl de tampão de ressuspensão (BR1) e agite no vórtex até que o pellet esteja visivelmente dissolvido.

7. Pipete a amostra para um tubo de processamento (PT) de 2 ml.



Utilize os tubos de processamento (PT) de 2 ml incluídos no PAXgene Blood RNA Kit.

8. Carregue os tubos de processamento (PT) abertos contendo a amostra no agitador de instrumentos QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 49; QIAcube: consulte a Figura 22, página 50). As posições da amostra estão numeradas para facilitar o carregamento. Introduza rolhas de suporte do agitador (incluídas com os instrumentos QIAcube) nas ranhuras existentes na extremidade do suporte do agitador junto a cada tubo de processamento. Isto permite a deteção de amostras durante a verificação do carregamento.



Certifique-se de que está instalado o adaptador do agitador correto (adaptador do agitador, 2 ml, tubos com fecho de segurança, marcados com "2", incluídos com os instrumentos QIAcube).



Se forem processadas menos de 12 amostras, certifique-se de que carrega o suporte do agitador conforme demonstrado na Figura 26, página 55. Não é possível processar uma (1) amostra ou 11 amostras. Os números de posição no suporte do agitador correspondem aos números de posição na centrífuga.

9. Feche a cobertura do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: consulte a Figura 18, página 44).

10. Seleccione o protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" e inicie o protocolo.

Siga as instruções que surgem no ecrã tátil do instrumento QIAcube.



Certifique-se de que estão instaladas as duas partes do programa (parte A e parte B) no instrumento QIAcube (consulte, "Instalar protocolos nos instrumentos QIAcube" página 45).



Os instrumentos QIAcube irão efetuar verificações de carregamento de amostras, pontas, adaptadores do rotor e frascos de reagente.

11. Depois de o protocolo "PAXgene Blood RNA Part A" terminar, abra a cobertura do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: consulte a Figura 18, página 44). Retire e elimine as colunas de rotação PAXgene RNA (PRC) dos adaptadores do rotor e os tubos de processamento (PT) vazios do agitador.



Durante o ensaio, as colunas de rotação são transferidas da posição 1 do adaptador do rotor (posição da tampa L1) para a posição 3 do adaptador do rotor (posição da tampa L2) pelo instrumento (consulte a Figura 24, página 53).

12. Feche as tampas de todos os tubos de microcentrifugação (MCT) de 1,5 ml que contêm o ARN purificado nos adaptadores do rotor (posição 3, posição da tampa L3, consulte a Figura 24, página 53). Transfira os tubos de processamento (MCT) de 1,5 ml no adaptador do agitador do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 49; QIAcube: consulte a Figura 22, página 50).

13. Feche a cobertura do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: consulte a Figura 18, página 44).

14. Selecione o protocolo "PAXgene Blood RNA Part B" e inicie o protocolo.

Siga as instruções que surgem no ecrã tátil do instrumento QIAcube.



Este programa incuba as amostras a 65 °C e desnatura o ARN para aplicações a jusante. Mesmo que a aplicação a jusante inclua um passo de desnaturação por calor, não omita este passo. A desnaturação de ARN suficiente é essencial para a máxima eficiência em aplicações a jusante.

15. Depois de o programa "PAXgene Blood RNA Part B" terminar, abra a cobertura do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: consulte a Figura 18, página 44). Coloque imediatamente os tubos de microcentrifugação (MCT) que contêm o ARN purificado em gelo.



AVISO: Superfície quente. O agitador pode atingir temperaturas até 70 °C. Evite tocar no mesmo quando estiver quente.



Não deixe o ARN purificado permanecer no instrumento QIAcube. Dado que as amostras não são arrefecidas, o ARN purificado pode degradar-se. Por conseguinte, não são recomendados ensaios de preparação de amostras sem vigilância durante a noite.

16. Caso não utilize as amostras de ARN de imediato, armazene a -20 °C ou -70 °C.

Dado que o ARN permanece desnaturado após ciclos repetidos de congelamento e descongelamento, não é necessário repetir o protocolo de incubação por calor ("PAXgene Blood RNA Part B"). Se as amostras de ARN forem utilizadas num ensaio de diagnóstico, siga as instruções fornecidas pelo fabricante.

Para quantificação exata do ARN por medição da absorvância a 260 nm, é recomendável diluir as amostras em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. \* A diluição da amostra com RNase-Free Water poderá resultar em valores muito baixos pouco fiáveis.

Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.



Para quantificação em tampão Tris-HCl, utilize a relação

$A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ . Consulte o Apêndice B, página 78.

17. Retire o suporte de frascos de reagente da mesa de trabalho do instrumento QIAcube (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 21, página 49; QIAcube: consulte a Figura 22, página 50) e feche todos os frascos com tampas adequadamente rotuladas. Os tampões em frascos podem ser armazenados à temperatura ambiente (15–25 °C) durante um período máximo de 3 meses. Retire e elimine os reagentes restantes nos tubos de processamento (PT) nas ranhuras para tubos de microcentrifugação do instrumento QIAcube. Retire e elimine os adaptadores do rotor da centrífuga. Esvazie a gaveta de resíduos do QIAcube Connect MDx (QIAcube Connect MDx: consulte a Figura 17, página 43; QIAcube: consulte a Figura 18, página 44). Feche a cobertura do instrumento QIAcube e desligue o instrumento no interruptor de alimentação.

# Guia de resolução de problemas

Este guia de resolução de problemas pode ser útil para resolver quaisquer problemas que possam surgir. Para obter mais informações, consulte a página de perguntas frequentes no nosso Centro de apoio técnico: [www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx](http://www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx). Os cientistas dos Serviços de assistência técnica da QIAGEN estão sempre prontos para responder a qualquer questão que possa surgir sobre as informações e os protocolos constantes deste manual ou sobre as tecnologias de amostragem e ensaio (para obter informações de contacto, consulte a última página ou visite [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)).

## Comentários e sugestões

---

### ARN degradado

Contaminação por RNase



Tenha cuidado para não introduzir qualquer RNase nos reagentes durante o procedimento ou manipulação posterior (consulte o Apêndice A, página 77).

### Baixo rendimento de ARN

a) Menos de 2,5 ml de sangue colhidos no PAXgene Blood RNA Tube (BRT)



Certifique-se de que são colhidos 2,5 ml de sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT; consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube*).

b) Concentração de ARN medido em água



O ARN deve ser diluído em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5\* para uma quantificação precisa (consulte o Apêndice B, página 78).

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

## Comentários e sugestões

---

- c) Detritos celulares transferidos para a coluna de rotação PAXgene RNA (PRC) nos passos 9 e 10 do protocolo manual
-  Evite transferir partículas de grandes dimensões ao pipetar o sobrenadante no passo 7 do protocolo manual (a transferência de pequenos detritos não irá afetar o procedimento).
- d) Sobrenadante não completamente removido no passo 3
-  Certifique-se de que é removida a totalidade do sobrenadante. Se o sobrenadante for decantado, elimine gotas da borda do PAXgene Blood RNA Tube (BRT) absorvendo com um toalhete de papel. Tome precauções adequadas para evitar a contaminação cruzada.
- e) Depois da colheita para o PAXgene Blood RNA Tube (BRT), o sangue é incubado durante menos de 2 horas
-  Incube o sangue no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante, pelo menos, 2 horas após a colheita.

Baixo valor de  $A_{260}/A_{280}$

- a) Água utilizada para diluir o ARN para a medição de  $A_{260}/A_{280}$
-  Utilize 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, para diluir o ARN antes de medir a pureza\* (consulte o Apêndice B, página 78).

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

## Comentários e sugestões

---

- b) O espectrofotômetro não foi corretamente ajustado a zero



Ajuste o espectrofotômetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotômetro não for devidamente ajustado para zero.

### Avaria do instrumento

Os instrumentos QIAcube não funcionaram corretamente

Leia o Manual do utilizador do QIAcube apropriado, prestando especial atenção à secção de Resolução de problemas. Certifique-se de que o instrumento QIAcube é objeto de uma manutenção adequada, conforme descrito no Manual do utilizador.

# Apêndice A: Observações genéricas sobre a manipulação do ARN

## Manipulação do ARN



As ribonucleases (RNases) são enzimas extremamente estáveis e ativas, que, habitualmente, não requerem cofatores para atuar. Dado que as RNases são difíceis de inativar, e mesmo quantidades mínimas são suficientes para destruir o ARN, não use nenhum material de plástico ou vidro sem eliminar primeiro uma possível contaminação por RNase. É necessário ter extremo cuidado para evitar introduzir acidentalmente RNases na amostra de ARN durante ou após o procedimento de purificação. Para criar e manter um ambiente livre de RNase, devem tomar-se precauções durante o pré-tratamento e utilização de soluções e recipientes descartáveis e não descartáveis enquanto se trabalha com o ARN.

## Manipulação geral



Ao trabalhar com o ARN, deve usar-se sempre uma técnica microbiológica asséptica adequada. As mãos e partículas de pó transportam bactérias e fungos e são as fontes mais comuns de contaminação por RNase. Use sempre luvas de látex ou vinil para manipular os reagentes e as amostras de ARN de modo a evitar a contaminação por RNase a partir da superfície da pele ou de equipamento de laboratório com poeira. Troque frequentemente de luvas e mantenha os tubos fechados sempre que possível. Mantenha o ARN purificado em gelo quando as alíquotas forem pipetadas para aplicações a jusante.

É possível encontrar protocolos para remoção da contaminação por RNase de material de vidro e soluções em guias gerais de biologia molecular, como Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

# Apêndice B: Quantificação e determinação da qualidade do ARN total

## Quantificação do ARN

A concentração do ARN deve ser determinada medindo a absorvância a 260 nm ( $A_{260}$ ) num espectrofotómetro. Para garantir a significância, as leituras devem estar dentro do intervalo linear do espectrofotómetro. A absorvância de 1 unidade a 260 nm corresponde a 44 µg de ARN por ml ( $A_{260} = 1 \Rightarrow 44 \mu\text{g/ml}$ ). Esta relação só é válida para medições em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5\*. Por conseguinte, se for necessário diluir a amostra de ARN, tal deve ser feito em 10 mM de Tris-HCl. Conforme discutido em baixo (consulte "Pureza do ARN", página 79), a relação entre os valores de absorvância a 260 e 280 nm fornece uma estimativa da pureza do ARN. Ao medir amostras de ARN, certifique-se de que as cuvetes estão livres de RNase. Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero. Abaixo encontra-se um exemplo do cálculo envolvido na quantificação do ARN.

Volume da amostra de ARN = 80 µl  
Diluição (1/15) = 10 µl da amostra de ARN + 140 µl de  
10 mM de Tris-HCl, pH 7,5

\* Ao trabalhar com substâncias químicas, use sempre uma bata de laboratório adequada, luvas descartáveis e óculos de proteção. Para obter mais informações, consulte as fichas de dados de segurança (FDS) disponibilizadas pelo distribuidor do produto.

Absorvância medida da amostra diluída numa cuvete (livre de RNase).

$$A_{260} = 0,3$$

$$\text{Concentração da amostra} = 44 \times A_{260} \times \text{fator de diluição}$$

$$= 44 \times 0,3 \times 15$$

$$= 198 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Rendimento total} = \text{concentração} \times \text{volume da amostra em mililitros}$$

$$= 198 \mu\text{g/ml} \times 0,08 \text{ ml}$$

$$= 15,8 \mu\text{g de ARN}$$

## Pureza do ARN

A relação das leituras a 260 nm e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) fornece uma estimativa da pureza do ARN no que se refere a contaminantes que são absorvidos por UV, tal como proteína. No entanto, a relação de  $A_{260}/A_{280}$  é consideravelmente influenciada pelo pH. Resultados de pH mais baixos resultam numa relação de  $A_{260}/A_{280}$  mais baixa e sensibilidade reduzida à contaminação por proteínas. \* Recomenda-se medir a absorvância em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5, para a obtenção de valores precisos. O ARN puro possui uma relação de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8–2,2 em 10 mM de Tris-HCl, pH 7,5. Ajuste o espectrofotómetro para zero, utilizando um branco com a mesma proporção de tampão de eluição (BR5) e tampões Tris-HCl que é utilizada nas amostras a medir. O tampão de eluição (BR5) possui uma elevada absorvância a 220 nm, o que pode conduzir a valores elevados de absorvância de fundo se o espectrofotómetro não for devidamente ajustado para zero.

\* Wilfinger, W.W., Mackey, M., and Chomczynski, P. (1997) Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques* **22**, 474.

# Apêndice C: Manipulação dos PAXgene Blood RNA Tubes (BRT)



As seguintes recomendações da BD podem ser úteis ao manipular PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Consulte o *Manual do PAXgene Blood RNA Tube* para obter mais informações sobre os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT).

## Instruções para remoção da tampa BD Hemogard

1. Segure o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) com uma mão, colocando o polegar por baixo da tampa BD Hemogard. (Para maior estabilidade, coloque o braço numa superfície fixa.) Com a outra mão, rode a tampa BD Hemogard empurrando simultaneamente para cima com o polegar da outra mão **APENAS ATÉ AFROUXAR A ROLHA DO TUBO**.
2. Afaste o polegar antes de levantar a tampa. **NÃO** use o polegar para retirar a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Cuidado: Se o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) contiver sangue, existe perigo de exposição. Para ajudar a evitar lesões durante a remoção da tampa, é importante que o polegar usado para levantar a tampa seja retirado do contacto com o PAXgene Blood RNA Tube (BRT) assim que a tampa BD Hemogard afrouxar.
3. Retire a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT). Na improvável eventualidade de a proteção de plástico se separar da rolha de borracha, **NÃO VOLTE A COLOCAR A TAMPA**. Remova cuidadosamente a rolha de borracha do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).

## Instruções para a introdução da tampa secundária BD Hemogard

1. Substitua a tampa do PAXgene Blood RNA Tube (BRT).
2. Rode e empurre firmemente para baixo até que a rolha fique completamente encaixada. A reintrodução total da rolha é necessária para que a tampa se mantenha firmemente presa no PAXgene Blood RNA Tube (BRT) durante a manipulação.

## Informações para encomendas

| Produto  | Índice   | N.º de cat. |
|--|--|-------------|
| PAXgene Blood RNA Kit (50)                                       | 50 PAXgene Spin Columns,<br>50 Shredder Spin Columns, tubos de processamento, DNase I livre de RNase e tampões e reagentes livres de RNase. A utilizar em conjunto com os PAXgene Blood RNA Tubes  | 762174      |
| PAXgene Blood RNA Tubes (100)                                    | 100 tubos de colheita de sangue  | 762165      |
| <b>Produtos relacionados que podem ser encomendados à QIAGEN</b> |  |             |
| Starter Pack, QIAcube  | O pacote inclui: suportes de frascos de reagente (3); tiras para rotulagem de suportes (8); pontas com filtro de 200 µl (1024); pontas com filtro de 1000 µl (1024); pontas com filtro de 1000 µl, diâmetro amplo (1024); frascos de reagente de 30 ml (18); adaptadores do rotor (240); suporte para o adaptador do rotor | 990395      |
| Filter-Tips, 1000 µl (1024)                                      | Pontas com filtro descartáveis esterilizadas, em suporte   | 990352      |

|                            |   |        |
|----------------------------|---|--------|
| Reagent Bottles, 30 ml (6) | Frascos de reagente (30 ml) com tampas; embalagem de 6; para utilização com o suporte de frascos de reagente do instrumento QIAcube | 990393 |
| Rotor Adapters (10 x 24)   | Para 240 preparações:<br>240 adaptadores do rotor descartáveis; para utilização com instrumentos QIAcube                            | 990394 |
| Reagent Bottle Rack        | Suporte com capacidade para 6 frascos de reagente de 30 ml na mesa de trabalho do instrumento QIAcube                               | 990390 |
| Rotor Adapter Holder       | Suporte para 12 adaptadores do rotor descartáveis; para utilização com instrumentos QIAcube   | 990392 |

#### **Produtos relacionados que podem ser encomendados à BD\***

|                                |  |        |
|--------------------------------|--|--------|
| Blood Collection Set           | BD Vacutainer® Safety-Lok™ 6 Blood Collection Set: Agulha de calibre 21G, 0,8 x 19 mm, tubagem de 305 mm com adaptador luer; 50 por caixa, 200 por embalagem | 367286 |
| BD Vacutainer One-Use Holder   | Embalagem apenas para 13 mm e 16 mm de diâmetro; 1000 por embalagem  | 364815 |
| BD Vacutainer Plus Serum Tubes | 13 x 75 mm, 4,0 ml de colheita com tampa BD Hemogard vermelha e rótulo de papel; 100 por caixa, 1000 por embalagem   | 368975 |

\* Estes acessórios para colheita de sangue representam produtos típicos que podem ser utilizados com os PAXgene Blood RNA Tubes (BRT). Para mais informações sobre estes acessórios, incluindo informações para encomendas, visite [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com).

Para obter informações de licenciamento atualizadas e renúncias de responsabilidades específicas do produto, consulte o manual do utilizador ou o manual do kit PreAnalytiX ou QIAGEN respetivo. Os manuais do utilizador e os manuais do kit PreAnalytiX e QIAGEN estão disponíveis em [www.preanalytix.com](http://www.preanalytix.com) e [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) ou podem ser solicitados à Assistência Técnica da PreAnalytiX.

## Histórico de revisões do manual

| Documento e revisão | Alterações   | Data           |
|---------------------|--|----------------|
| HB-0101-004, R2     | Alterações para garantir a conformidade com a regulamentação GHS em todo o documento   | Junho 2015     |
| HB-0101-005, R3     | Novo modelo; revisões ao protocolo automatizado e aos dados de desempenho; atualização das Informações de segurança para garantir a conformidade com a regulamentação GHS; alterações aos detalhes do instrumento e à declaração de Limitações de utilização do produto. | Fevereiro 2019 |
| HB-0101-006, R3     | Correção do nome do kit na tabela Conteúdos do kit, página 5.  | Janeiro 2020   |
| HB-0101-007, R4     | Adição do QIAcube Connect MDx ao protocolo automatizado; atualização da linguagem ao longo do texto para incluir referências ao QIAcube Connect MDx; atualização dos números de tabela, página e figura em todo o texto.   | Dezembro 2020  |

## PreAnalytiX Worldwide

Os produtos PreAnalytiX são distribuídos pelas empresas QIAGEN e BD

### QIAGEN – Apoio ao cliente

Encomendas [www.QIAGEN.com/shop](http://www.QIAGEN.com/shop) | Apoio técnico [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | Site [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)

### BD – Apoio ao cliente

Argentina, Uruguay and Paraguay

Orders: 0800.444.5523

E-mail: [crc\\_argentina@bd.com](mailto:crc_argentina@bd.com)

Australia

Orders: 1.800.656.100

Fax: 1.800.656.110

E-mail: [bd\\_anz@bd.com](mailto:bd_anz@bd.com)

Austria

Orders: 43.1.7063660

Fax: 43.1.706366011

E-mail: [customercare.at@bd.com](mailto:customercare.at@bd.com)

Belgium

Orders: 32.53.720.556

Fax: 32.53.720.549

E-mail: [orders.be@bd.com](mailto:orders.be@bd.com)

Brazil

Orders: 0800.055.56.54

E-mail: [consultoria\\_vacutainer@bd.com](mailto:consultoria_vacutainer@bd.com)

Canada

Technical support: 1.800.631.0174

Orders: 1.866.979.9408

Fax: 1.800.565.0897

E-mail: [customer.service.canada@bd.com](mailto:customer.service.canada@bd.com)

Central and Eastern Europe

Orders: 48.22.377.11.11

Fax: 48.22.377.11.02

Bulgaria orders: [info\\_bulgaria@bd.com](mailto:info_bulgaria@bd.com)

Czech Republic orders: [info\\_czech@bd.com](mailto:info_czech@bd.com)

Croatia orders: [info\\_croatia@bd.com](mailto:info_croatia@bd.com)

Hungary orders: [info\\_hungary@bd.com](mailto:info_hungary@bd.com)

Poland orders: [info\\_poland@bd.com](mailto:info_poland@bd.com)

Romania orders: [info\\_romania@bd.com](mailto:info_romania@bd.com)

Southeast Europe orders: [info\\_balkan@bd.com](mailto:info_balkan@bd.com)

Serbia orders: [info\\_serbia@bd.com](mailto:info_serbia@bd.com)

Slovakia orders: [info\\_slovakia@bd.com](mailto:info_slovakia@bd.com)

Slovenia orders: [info\\_slovenia@bd.com](mailto:info_slovenia@bd.com)

Denmark

Orders: 45.43.43.45.66

Fax: 45.43.96.56.76

Orders: [ordre.dk@bd.com](mailto:ordre.dk@bd.com)

Technical support: [bddenmark@bd.com](mailto:bddenmark@bd.com)

Finland

Orders: 358.9.88.70.780

Fax: 358.9.88.70.7816

Orders: [tilauksef.fi@bd.com](mailto:tilauksef.fi@bd.com)

E-mail: [bdsuomi@bd.com](mailto:bdsuomi@bd.com)

France

Orders: 33.476.68.36.36

Fax: 33.476.68.36.93

E-mail: [serviceclientbdf@bd.com](mailto:serviceclientbdf@bd.com)

Orders: [commandesfr@bd.com](mailto:commandesfr@bd.com)

Technical support: [vacutainerfr@bd.com](mailto:vacutainerfr@bd.com)

Germany

Orders: 49.6221.3050

Fax: 49.6221.305.216

E-mail: [customercare.de@bd.com](mailto:customercare.de@bd.com)

India

Orders: 91.124.3949390

Orders: [bd\\_india@bd.com](mailto:bd_india@bd.com)

Ireland (Aquilant Specialist Healthcare Services)

Customer support: 353.1.404.8350

Fax: 353.1.404.8352

E-mail: [contactus@aquilantscientific.ie](mailto:contactus@aquilantscientific.ie)

Israel (Lapidot Medical)

Customer Support: 972.700.70.90.22

E-mail: [cs@lapidot.com](mailto:cs@lapidot.com)

Italy

Orders: 39.02.48240.500

Fax: 39.02.48240.775

Technical support: 39.3450655140

E-mail: [ordini.it@bd.com](mailto:ordini.it@bd.com)

Middle East & Africa  
Orders: 971.45.592.555  
Fax: 971.45.592.599  
E-mail: EMA\_PAS@bd.com

The Netherlands  
Orders: 31.20.582.94.20  
Fax: 31.20.582.94.21  
Orders: orders.nl@bd.com

New Zealand  
Orders: 0800.572.468  
Fax: 0800.572.469  
E-mail: nz\_customerservice@bd.com

Norway  
Customer Support: 64.00.99.00  
E-mail: bdnorge@bd.com  
Orders: ordre.no@bd.com

Southeast Asia  
E-mail: PAS.SEA@bd.com  
Indonesia orders: 622.1577.1920  
Malaysia orders: 603.2093.8788  
Philippines orders: 63.2478.8881  
Singapore orders: 65.6861.0633  
Thailand orders: 662.646.1800  
Vietnam orders: 848.3822.7409

South Korea  
Orders: 02.3404.3706  
Fax: 02.3404.3785  
Technical: 02.3404.3706  
Technical support: Korea\_PAS@bd.com

Spain, Portugal and Andorra  
Orders: 34.91.848.8174  
Customer support: 34.902.27.17.27  
Fax: 34.91.848.8115  
E-mail: info.spain@bd.com

Sweden  
Orders: 46.8.775.51.00  
Fax: 46.8.645.08.08  
Orders: order.se@bd.com  
Technical support: bds sweden@bd.com

Switzerland  
Orders: 41.61.485.22.24  
Fax: 41.61.485.22.00  
E-mail: info.ch@bd.com

UK  
Orders: 0800.917.8776  
E-mail: bduk\_customerservice@bd.com

USA  
Customer support: 800.631.0174  
E-mail: productcomplaints@bd.com



HB-0101-007 1122120PT BD-8945 12/2020  
Produto da Alemanha