

MANUAL TÉCNICO

# Maxwell<sup>®</sup> CSC Genomic DNA Kit

Instruções de utilização do produto  
**AS1850**

**Atenção:** manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

# Maxwell<sup>®</sup> CSC Genomic DNA Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: [www.promega.com/protocols/](http://www.promega.com/protocols/)  
 Visite o website para verificar se está a utilizar a versão mais atual deste Manual técnico. Se tiver quaisquer dúvidas sobre a utilização deste sistema, envie um e-mail para o nosso centro de assistência, Promega Technical Services: [techserv@promega.com](mailto:techserv@promega.com)

1. Descrição .....	2
2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos.....	3
3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto .....	5
4. Limitações de utilização do produto.....	5
5. Antes de começar .....	5
5.A. Preparar amostras de sangue total e camada leuco-plaquetária.....	6
5.B. Preparar amostras de aspirado de medula óssea.....	7
5.C. Preparar amostras de precipitado de células .....	8
5.D. Preparar lisatos de amostras de sangue total, camada leuco-plaquetária, medula óssea e precipitado de células.....	9
5.E. Preparar lisatos de amostras de tecido.....	10
5.F. Preparar lisatos de amostras de zaragoas bucais.....	11
5.G. Preparar o Maxwell <sup>®</sup> CSC Genomic DNA Cartridge .....	13
6. Execução do Maxwell <sup>®</sup> Instrument .....	15
7. Pós-purificação .....	17
8. Avaliação do desempenho analítico.....	17
8.A. Colheita de DNA .....	18
8.B. Qualidade de DNA (Pureza).....	24
8.C. Reprodutibilidade .....	30
8.D. Amplificabilidade .....	31
8.E. Inibição (Substâncias interferentes).....	40
8.F. Contaminação cruzada .....	46
9. Avaliação do desempenho clínico.....	47
10. Resolução de Problemas .....	48
11. Produtos Relacionados .....	51

O Maxwell® CSC Genomic DNA Kit está disponível apenas em alguns países.

## 1. Descrição

O Maxwell® CSC Genomic DNA Kit<sup>(a)</sup> é utilizado com os Maxwell® Instruments especificados na Tabela 1, de modo a proporcionar um método fácil para a preparação das amostras e a purificação automática e eficiente de DNA genômico (gDNA) a partir de uma variedade de amostras biológicas humanas. Os Maxwell® CSC Instruments são concebidos para serem utilizados com cartuchos de reagentes pré-dispensados e métodos de purificação pré-programados, proporcionando uma maior simplicidade e comodidade. O método Maxwell® para o CSC Genomic DNA Kit consegue processar desde um até ao número máximo de amostras do Maxwell® CSC Instrument em menos de 40 minutos. O DNA purificado pode ser utilizado diretamente em diversas aplicações a jusante, como ensaios baseados na PCR.

**Tabela 1. Instrumentos suportados.**

<b>Instrumento</b>	<b>Cat.#</b>	<b>Manual técnico</b>	<b>Número de amostras máximo</b>
Maxwell® CSC	AS6000	TM457	16
Maxwell® CSC 48	AS8000	TM623	48

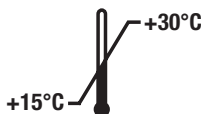
## Princípio do método

O Maxwell® CSC Genomic DNA Kit purifica o ácido nucleico de amostras utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel que otimiza a captura, a lavagem e a purificação de amostras de gDNA. Os Maxwell® Instruments são instrumentos de manuseamento de partículas magnéticas que ligam de maneira eficiente os ácidos nucleicos às partículas paramagnéticas no primeiro poço de um cartucho pré-cheio. As amostras são processadas através de uma série de lavagens antes de o gDNA ser eluído. Esta abordagem de captura magnética evita problemas comuns, como pontas entupidas ou transferências de reagentes parciais, que resultam no processamento subótimo da purificação por outros sistemas automáticos normalmente utilizados.

## 2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC Genomic DNA Kit	48 preparações	AS1850

Para utilização em diagnóstico in vitro. Apenas para utilização profissional. Contém reagentes suficientes para 48 isolamentos automáticos a partir de uma variedade de amostras biológicas humanas. Os cartuchos destinam-se apenas a uma única utilização.



Inclui:

- 2 × 1 ml Solução de proteinase K (PK)
- 1 ml Solução de RNase A
- 20 ml Tampão de lise
- 20 ml Intensificador Lítico (LE2)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ)
- 50 Êmbolos CSC/RSC
- 50 Tubos de eluição (0,5 ml)
- 20 ml Tampão de eluição

**Condições de armazenamento:** armazene o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit entre +15 °C a +30 °C.



**Informações de segurança:** os Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) contêm etanol e isopropanol. Estas substâncias devem ser consideradas como inflamáveis, nocivas e irritantes. Consulte a Ficha de dados de segurança (SDS) para obter informações detalhadas sobre segurança. Cumpras as diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de resíduos químicos utilizados com este sistema.



Os Maxwell® CSC Cartridges (CSCQ) foram concebidos para utilização com substâncias potencialmente infecciosas. Deve ser utilizada proteção adequada (por exemplo, luvas e óculos de proteção) ao manusearem substâncias infecciosas. Cumpras as suas diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de substâncias infecciosas quando utilizadas com este sistema.



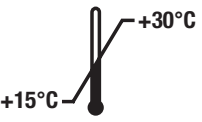















**Atenção:** manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

**Informações adicionais:** os componentes do Maxwell® CSC Genomic DNA Kit são qualificados e testados de acordo com o controlo de qualidade para trabalharem em conjunto. Não misture componentes de kits com lotes de kits diferentes. Utilize apenas os componentes fornecidos no kit. Para obter informações de segurança adicionais, consulte a Ficha de dados de segurança, disponível em: [www.promega.com](http://www.promega.com).

## 2. Componentes do produto, condições de armazenamento e legenda dos símbolos (continuação)

### Legenda dos símbolos

Símbolo	Explicação	Símbolo	Explicação
	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro		Representante autorizado
	Conserve entre +15 °C e +30 °C.		Fabricante
	Risco de saúde		Corrosivo
	Irritante		Inflamável
	Conformidade Europeia		Conteúdo suficiente para "n" testes
	Aviso. Perigo de entalamento.		Atenção
	Número de lote		Aviso. Riscos biológicos.
	Não reutilizar		Número de catálogo

### 3. Finalidade prevista/Utilização prevista do produto

O Maxwell® CSC Genomic DNA Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com os Maxwell® CSC Instruments e os métodos de purificação Maxwell® CSC e Maxwell® CSC 48 Genomic DNA, como um dispositivo médico (IVD) para diagnóstico in vitro para a realização do isolamento automático de DNA genômico a partir de uma variedade de amostras biológicas humanas. O DNA genômico purificado é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base em amplificação.

O Maxwell® CSC Genomic DNA Kit destina-se a ser utilizado a uma temperatura entre 15–30 °C. A utilização fora deste intervalo de temperatura pode dar origem a resultados subótimos.

O Maxwell® CSC Genomic DNA Kit destina-se exclusivamente a utilização profissional. Os resultados do diagnóstico obtidos através da utilização de DNA genômico purificado com este sistema devem ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos ou laboratoriais.

### 4. Limitações de utilização do produto

O Maxwell® CSC Genomic DNA Kit foi validado com amostras de sangue total humano, camada leuco-plaquetária, medula óssea, zaragatoas bucais, tecidos e células. O utilizador é responsável por validar a sua utilização para extrair DNA de outros tipos de amostra.

Devem ser incluídos controlos adequados em todas as aplicações de diagnóstico a jusante que utilizem DNA genômico purificado com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. O utilizador é responsável por estabelecer as características de desempenho necessárias às aplicações de diagnóstico a jusante.

### 5. Antes de começar

#### Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- agitador vortex de bancada
- pipetadores e pontas de pipeta para transferência de amostras para cartuchos de reagentes pré-cheios
- recomenda-se a utilização de tubos de 1,5–2,0 ml para a incubação de amostras (por exemplo, microtubos, 1,5 ml [Cat.# V1231]). Outros tipos de tubo devem ser avaliados pelo laboratório.
- bloco de aquecimento seco, banho de água ou agitador térmico definidos para 56 °C
- água desionizada ou Nuclease-Free Water (Cat.# MC1191) para amostras de precipitado de células (Secção 5.C) e amostras de tecido (Secção 5.E)
- 1X tampão fosfato-salino (PBS) para amostras de precipitado de células preparadas a partir de urina (Secção 5.C)
- **Opcional:** colunas de compensação (Cat.# Z3871) para amostras de zaragatoas bucais (Secção 5.F)
- **Opcional:** agitador de tubos rotativo

## **5.A. Preparar amostras de sangue total e camada leuco-plaquetária**

### **Capacidade de processamento da amostra**

A colheita de DNA genómico total a partir de amostras de sangue total e camada leuco-plaquetária depende do volume da amostra e do número de glóbulos brancos (WBC) por mililitro. Para estes tipos de amostra, pode ser utilizado um intervalo de volumes de amostras de 50–300 µl. Durante o desenvolvimento, sangue total e camada leuco-plaquetária preparados a partir de sangue total com um intervalo de  $4 \times 10^6$  a  $10 \times 10^6$  WBC/ml foram testados e verificou-se que fornecem um desempenho aceitável. As amostras fora deste intervalo podem ser compatíveis com a química de extração mas devem ser avaliadas pelo laboratório relativamente ao desempenho de extração e compatibilidade com ensaios a jusante.

Um intervalo de volumes de eluição de 50–200 µl pode ser utilizado para amostras de sangue total. Como, normalmente, as amostras de camada leuco-plaquetária originam uma colheita de uma quantidade elevada de DNA genómico, recomenda-se uma eluição com 200 µl para fornecer a eluição mais eficaz. Os volumes de eluição de 50–200 µl podem ser utilizados com amostras de camada leuco-plaquetária mas volumes inferiores a 200 µl podem não fornecer resultados ótimos.

### **Notas:**

- a. Este kit foi testado com amostras de sangue total humano e camada leuco-plaquetária preparadas a partir de sangue total humano e recolhidas em tubos de EDTA, de citrato ou de heparina. O utilizador deve avaliar o desempenho deste kit com outros tipos de tubos para recolha de sangue.
  - b. Este kit foi testado com amostras de sangue e camada leuco-plaquetária armazenadas ao abrigo das seguintes condições: armazenadas a 15–30 °C durante até 72 horas, armazenadas a 2–10 °C durante até 7 dias ou armazenadas a –65 °C ou inferior antes da purificação do DNA. Outras condições de armazenamento de amostras podem fornecer um desempenho aceitável mas devem ser avaliadas pelo laboratório. As amostras congeladas devem ser descongeladas na totalidade antes do processamento. Todas as amostras de sangue e camada leuco-plaquetária devem ser misturadas cuidadosamente antes da utilização.
1. Misture todas as amostras de sangue ou camada leuco-plaquetária durante, pelo menos, 5 minutos a 15–30 °C. Isto pode ser realizado utilizando um agitador de tubos rotativo ou misturando intermitentemente com um agitador vórtex.
  2. Prossiga para a Secção 5.D para obter as instruções de preparação do lisato.

## **5.B. Preparar amostras de aspirado de medula óssea**

### **Capacidade de processamento da amostra**

A colheita total de DNA genómico de amostras de aspirado de medula óssea depende do número total de células a processar. Durante o desenvolvimento, as amostras de aspirado de medula óssea no intervalo de volumes de 50–300 µl foram testadas e verificou-se que fornecem um desempenho aceitável. As amostras fora deste intervalo podem ser compatíveis com a química de extração mas devem ser avaliadas pelo laboratório relativamente ao desempenho de extração e compatibilidade com ensaios a jusante.

Como, normalmente, as amostras de aspirado de medula óssea originam uma colheita de uma quantidade elevada de DNA genómico, recomenda-se eluir com 200 µl para fornecer a eluição mais eficaz. Os volumes de eluição de 50–200 µl podem ser utilizados com amostras de medula óssea mas volumes inferiores a 200 µl podem não fornecer resultados ótimos.

### **Notas:**

- a. Este kit foi testado com amostras de aspirado de medula óssea humana recolhidas em tubos de EDTA, de citrato ou de heparina. O utilizador deve avaliar o desempenho deste kit com outros tipos de tubos para recolha de sangue.
  - b. Este kit foi testado com amostras de aspirado de medula óssea armazenadas congeladas (armazenadas a –65 °C ou inferior) antes da purificação do DNA. Outras condições de armazenamento de amostras podem fornecer um desempenho aceitável mas devem ser avaliadas pelo laboratório. As amostras congeladas devem ser descongeladas na totalidade antes do processamento. Todas as amostras de aspirado de medula óssea devem ser misturadas cuidadosamente antes da utilização.
1. Misture todas as amostras de aspirado de medula óssea durante, pelo menos, 30 minutos a 15–30 °C utilizando um agitador de tubos rotativo ou misturando intermitentemente com um agitador vórtex.
  2. Prossiga para a Secção 5.D para obter as instruções de preparação do lisato.

## 5.C. Preparar amostras de precipitado de células

### Capacidade de processamento da amostra

Os precipitados de células podem ser gerados a partir de vários tipos de amostra incluindo fluidos biológicos (por exemplo, urina ou líquido amniótico), células purificadas (por exemplo, células mononucleares do sangue periférico) ou células em cultura. A centrifugação da amostra é utilizada para gerar um precipitado de células e esse precipitado é ressuspensionado em 300 µl de Nuclease-Free Water. A colheita total de DNA genômico a partir de amostras de precipitado de células depende do número de células presentes na amostra. Durante o desenvolvimento, precipitados de células de até  $5 \times 10^6$  células foram testados (consulte a Tabela 2) e verificou-se que fornece um desempenho aceitável. As amostras fora deste intervalo podem ser compatíveis com a química de extração mas devem ser avaliadas pelo laboratório relativamente ao desempenho de extração e compatibilidade com ensaios a jusante.

**Tabela 2. Os tipos de amostras de precipitado de células avaliados.**

Tipo de amostra	Intervalo de amostras testado	Volume de eluição sugerido
Urina	15–50 ml	50 µl
Líquido amniótico	1–5 ml	50 µl
Células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	$5 \times 10^4$ – $5 \times 10^6$ células	50–200 µl
Células em cultura	$5 \times 10^2$ – $5 \times 10^6$ células	50–200 µl

No caso de amostras de precipitado de células, utilize um intervalo de volumes de eluição de 50–200 µl. Ao processar amostras que geram números de células baixos no precipitado de células, recomendamos o uso de um volume de eluição de 50 µl. No caso de amostras com mais células, um volume de eluição maior pode resultar em colheitas de DNA genômico maiores. Os laboratórios devem confirmar que o volume de eluição de um determinado tipo de amostra de precipitado de células fornece pureza e concentração suficientes para o seu ensaio a jusante.

### Notas:

- a. Este kit foi testado com amostras de precipitado de células processadas imediatamente depois de gerar um precipitado de células e armazenada congeladas (armazenadas a  $-65$  °C ou inferior) antes da purificação do DNA. Outras condições de armazenamento de amostras podem fornecer um desempenho aceitável mas devem ser avaliadas pelo laboratório. As amostras congeladas devem ser descongeladas na totalidade antes do processamento.
  - b. Se pretender congelar amostras, estas devem ser armazenadas congeladas depois de gerar o precipitado de células. Recolher um precipitado de células de uma amostra que tenha sido congelada e descongelada pode resultar na perda de desempenho.
1. Centrifugue o volume da amostra pretendido a uma velocidade de, pelo menos,  $2000 \times g$  durante 20 minutos para gerar um precipitado de células.
    - a. No caso de amostras de urina, lave o precipitado de células ressuspensionando em 750 µl de 1X PBS.
    - b. Centrifugue a amostra suspensa em PBS para gerar um precipitado de células.

2. Decante ou aspire o líquido das células precipitadas. Ressuspenda o precipitado em 300 µl de Nuclease-Free Water.
3. Prossiga para a Secção 5.D para obter as instruções de preparação do lisato.

#### **5.D. Preparar lisatos de amostras de sangue total, camada leuco-plaquetária, medula óssea e precipitado de células**

1. Prepare e etiquete os tubos de incubação que irão encaixar num bloco de aquecimento definido para 56 °C.
2. Adicione 30 µl de solução de proteinase K (PK) a cada tubo de incubação.
3. Transfira o volume de amostra pretendido para cada tubo de incubação. Mude as pontas de pipeta entre cada transferência de sangue para evitar a contaminação cruzada.  
**Nota:** transferir material coagulado, gorduroso ou outro material sólido no tubo de incubação pode resultar numa lise da amostra fraca. Transfira apenas amostra líquida para o tubo de incubação.
4. Tape e agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.
5. Adicione 300 µl de Intensificador Lítico (LE2) a cada tubo de incubação. Substitua as pontas de pipeta sempre que dispensar Intensificador Lítico (LE2) para evitar a contaminação cruzada.  
**Nota:** prossiga para o Passo 6 sem misturar ou agitar por rotação.
6. Adicione 300 µl de tampão de lise a cada tubo de incubação. Substitua as pontas de pipeta sempre que dispensar tampão de lise para evitar a contaminação cruzada.
7. Tape e agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.  
**Nota:** confirme que o agitar por rotação resultou num lisato homogéneo.
8. Incube cada tubo no bloco de aquecimento de 56 °C durante 20 minutos. Durante esta incubação, prepare os Maxwell® CSC Cartridges conforme descrito na Secção 5.G.
9. Agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.
10. Transfira cada uma das amostras de lisato do tubo de incubação para o poço n.º 1 de um cartucho separado e misture bem com a solução de ligação no poço n.º 1 aspirando e dispensando 5–10 vezes após a transferência para fazer uma mistura homogénea (poço n.º 1 é o maior poço no cartucho). Mude as pontas entre cada transferência de sangue para evitar a contaminação cruzada da amostra.  
**Nota:** a não criação de uma mistura homogénea do lisato da amostra e da solução de ligação no poço n.º 1 do cartucho pode resultar em colheita e pureza diminuídas do eluato final.

## 5.E. Preparar lisatos de amostras de tecido

### Capacidade de processamento da amostra

A colheita total de DNA genómico de amostras de tecido depende da massa e tipo de tecido a processar. No caso de amostras de tecido, pode ser utilizado um intervalo de amostras de 5–50 mg. Durante o desenvolvimento, foram avaliadas amostras de tecido do coração, pâncreas, cérebro e mama como exemplares e verificou-se que fornecem um desempenho aceitável. Um leque mais vasto de tipos de tecido podem ser compatíveis com a química de extração mas devem ser avaliadas pelo laboratório relativamente ao desempenho de extração e compatibilidade com ensaios a jusante.

Um intervalo de volumes de eluição de 50–200 µl pode ser utilizado para amostras de tecido. O volume de tampão de eluição a utilizar depende da massa e tipo de tecido a processar. Os laboratórios devem avaliar os volumes de eluição que fornecem um desempenho aceitável nos seus ensaios a jusante para a massa e tipos de tecido a processar.

**Nota:** este kit foi testado com amostras de tecido armazenadas congeladas (armazenadas a –65 °C ou inferior) antes da purificação do DNA. Outras condições de armazenamento de amostras podem fornecer um desempenho aceitável mas devem ser avaliadas pelo laboratório. As amostras congeladas devem ser descongeladas na totalidade antes do processamento.

1. Para realizar a lise das amostras de tecido, defina a temperatura de um bloco de aquecimento seco, banho de água ou agitador térmico para 56 °C. Prepare e etiquete os tubos de incubação que irão encaixar na opção de aquecimento pretendida.
2. Transfira 5–50 mg de tecidos para cada tubo. Corte o tecido em fragmentos mais pequenos pode diminuir o tempo de lise. Centrifugue o tubo à velocidade superior durante 15 segundos para recolher os bocados de tecido no fundo do tubo.
3. Adicione 300 µl de Nuclease-Free Water (Cat. # MC1191 ou equivalente) para cada tubo de incubação.
4. Adicione 30 µl de solução de proteinase K (PK) a cada tubo de incubação. Substitua as pontas de pipeta sempre que dispensar a solução de proteinase K (PK) para evitar a contaminação cruzada.
5. Tape e agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.
6. Adicione 300 µl de Intensificador Lítico (LE2) a cada tubo de incubação. Substitua as pontas de pipeta sempre que dispensar Intensificador Lítico (LE2) para evitar a contaminação cruzada.
7. Tape e agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.
8. Incube cada tubo a 56 °C utilizando uma das seguintes opções:
  - a. Com um agitador térmico, utilize uma velocidade de agitação elevada (por exemplo, 1,500 rpm) durante até 2 horas.
  - b. Com um bloco de aquecimento seco ou aquecedor do banho de água, utilize sem agitar durante, pelo menos, 16 horas.
9. Agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.
10. Centrifugue cada tubo á velocidade máxima numa microcentrifugadora durante 5 minutos para precipitar qualquer material não digerido.

11. Transfira todo o sobrenadante de cada tubo de incubação para um novo tubo. Evite transferir qualquer material precipitado. Se surgir uma camada gordurosa distinta no topo da amostra após a centrifugação, não transfira essa camada para o novo tubo.
12. Adicione 300 µl de tampão de lise a cada novo tubo. Substitua as pontas de pipeta sempre que dispensar tampão de lise para evitar a contaminação cruzada.
13. Tape e agite por rotação cada um dos tubos à velocidade máxima durante 10 segundos.
14. Prepare os cartuchos conforme descrito na Secção 5.G.
15. Transfira a amostra de lisato do tecido de cada tubo de incubação para o poço n.º 1 de um cartucho separado e misture bem com a solução de ligação no poço n.º 1 aspirando e dispensando, pelo menos, 10 vezes após a transferência para fazer uma mistura homogênea (poço n.º 1 é o maior poço no cartucho). Mude as pontas entre cada transferência de sangue para evitar a contaminação cruzada da amostra.

**Notas:**

- a. Transferir o precipitado de tecido ou camada gordurosa do tubo de incubação para o novo tubo pode resultar em colheita ou purezas fracas.
- b. A não criação de uma mistura homogênea do lisato da amostra e da solução de ligação no poço n.º 1 do cartucho pode resultar em colheita e pureza diminuídas no eluato final.

## **5.F. Preparar lisatos de amostras de zaragoas bucais**

### **Capacidade de processamento da amostra**

A colheita total de DNA genómico de amostras de zaragoas bucais depende de quão bem as células bucais são transferidas para a zaragatoa. Durante o desenvolvimento, foram testadas 1 e 2 zaragoas bucais e forneceram desempenho aceitável. Um intervalo de volumes de eluição de 50–200 µl pode ser utilizado para amostras de zaragoas bucais. Os laboratórios devem escolher um volume de eluição para amostras de zaragoas bucais que fornece pureza e concentração suficientes para o seu ensaio a jusante.

**Nota:** este kit foi testado com amostras de zaragoas bucais secas armazenadas a 15–30 °C antes da purificação do DNA. Outras condições de armazenamento de amostras podem fornecer um desempenho aceitável mas devem ser avaliadas pelo laboratório.

1. Prepare e etiquete os tubos de incubação de 1,5–2,0 ml que irão encaixar no bloco de aquecimento definido para 56 °C.
2. **Opcional:** coloque uma coluna de compensação (Cat.# Z3871) em cada tubo de incubação.
3. Coloque 1–2 cabeça(s) de zaragatoa bucal em cada tubo de incubação ou coluna de compensação em cada tubo de incubação. Remova a vara da(s) cabeça(s) de zaragatoa bucal cortando ou partindo a vara da zaragatoa acima da cabeça da zaragatoa para que seja possível fechar a tampa no tubo ou coluna de compensação contendo a cabeça da zaragatoa.

## 5.F. Preparar lisatos de amostras de zaratogais bucais (continuaçãõ)

- Num tubo separado, combine 300 µl de Intensificador Lítico (LE2) com 30 µl da soluçãõ de proteinase K (PK) para cada amostra mais uma amostra extra. Consulte a tabela abaixo. Por exemplo, para processar 16 amostras, crie uma Master Mix para 17 reações combinando  $300 \mu\text{l} \times 17 = 5100 \mu\text{l}$  de Intensificador Lítico (LE2) e  $30 \mu\text{l} \times 17 = 510 \mu\text{l}$  de soluçãõ de proteinase K.

Reagente	Quantidade por reaçãõ	Reações (Número da amostra + 1)	Total
Intensificador Lítico (LE2)	300 µl	n+1	$300 \times (n+1) \mu\text{l}$
Soluçãõ de proteinase K (PK)	30 µl	n+1	$30 \times (n+1) \mu\text{l}$

- Misture o Intensificador Lítico (LE2)/Soluçãõ de proteinase K (PK) invertendo o tubo, pelo menos, 10 vezes.
- Adicione 330 µl de Intensificador Lítico (LE2)/Soluçãõ de proteinase K (PK) para cada amostra e feche o tubo. Substitua as pontas de pipeta sempre que dispensar o Intensificador Lítico (LE2)/a soluçãõ de proteinase K (PK) para evitar a contaminaçãõ cruzada.
- Incube cada tubo a 56 °C durante 20 minutos. Durante esta incubaçãõ, prepare os cartuchos conforme descrito na Seçãõ 5.G.
- Utilize uma das seguintes opções para remover a(s) cabeçã(s) de zaratogã do tubo:
  - Se utilizar uma coluna de compensaçãõ, coloque o tubo numa microcentrifugadora e centrifugue à velocidade máxima durante 2 minutos. Remova o tubo da microcentrifugadora. Abra o tubo; remova e elimine a coluna de compensaçãõ contendo a(a) cabeçã(s) de zaratogã.
  - Se não utilizar uma coluna de compensaçãõ, use pinças para remover a(s) cabeçã(s) de zaratogã do tubo, apertando cuidadosamente o restante lisato da(s) cabeçã(s) de zaratogã. Elimine a(s) cabeçã(s) de zaratogã. Limpe a pinça e mude de luvas entre a remoçãõ de cada cabeçã de zaratogã para prevenir a contaminaçãõ cruzada.
- Adicione 300 µl de tampãõ de lise ao poço n.º 1 de cada cartucho a utilizar (o poço n.º 1 é o maior poço no cartucho).
- Transfira cada uma das amostras de lisato da zaratogã do tubo de incubaçãõ para o poço n.º 1 de um cartucho separado e misture com o tampãõ de lise e a soluçãõ de ligaçãõ no poço n.º 1 aspirando e dispensando 5–10 vezes após a transferênciã para fazer uma mistura homogênea (poço n.º 1 é o maior poço no cartucho). Mude as pontas entre cada transferênciã de sangue para evitar a contaminaçãõ cruzada da amostra.
 

**Nota:** a não criaçãõ de uma mistura homogênea do lisato da amostra, tampãõ de lise e soluçãõ de ligaçãõ no poço n.º 1 pode resultar em colheita e pureza diminuídas no eluato final.

## 5.G. Preparar o Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge

1. Troque de luvas antes de manusear os cartuchos, os êmbolos CSC/RSC e os tubos de eluição (0,5 ml). Os cartuchos estão instalados nos tabuleiros da plataforma fora do instrumento antes de transferir os tabuleiros da plataforma que contém os cartuchos e as amostras para o instrumento para purificação. Coloque cada um dos cartuchos no(s) tabuleiro(s) da plataforma com o poço n.º 1 (o poço maior do cartucho) o mais afastado possível dos tubos de eluição (Figura 2). Pressione para baixo o cartucho de forma a encaixá-lo na respetiva posição. Certifique-se de que ambas as extremidades do cartucho estão totalmente encaixadas no tabuleiro da plataforma. Remova cuidadosamente o selo de forma a retirar a totalidade do selo da parte superior do cartucho. Certifique-se de que remove a totalidade da película aderente vedante e eventuais resíduos de adesivo do cartucho.



**Atenção:** manuseie os cartuchos com cuidado. As extremidades do selo podem ser cortantes.

2. Adicione 15 µl de Solução de RNase A no poço n.º 3 do Maxwell® CSC Cartridge (CSCQ).
3. Coloque um êmbolo no poço n.º 8 de cada cartucho.
4. Coloque um tubo de eluição vazio na posição do tubo de eluição de cada cartucho no(s) tabuleiro(s) da plataforma.

**Nota:** utilize apenas os tubos de eluição fornecidos no Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. Outros tubos de eluição podem ser incompatíveis com o Maxwell® CSC Instruments e afetar o desempenho de purificação de DNA.

5. Adicione 50–200 µl de tampão de eluição ao fundo de cada tubo de eluição.

**Nota:** utilize apenas o tampão de eluição fornecido no Maxwell® CSC Genomic DNA Kit. A utilização de outros tampões de eluição pode afetar o desempenho da purificação de DNA.

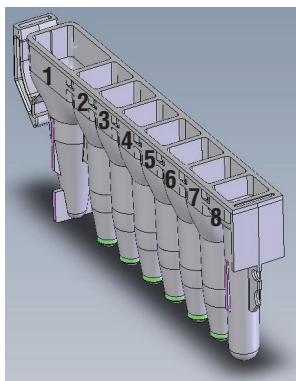
6. Prossiga para a Seção 6, Execução do Maxwell® Instrument.

## 5.G. Preparar o Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge (continuação)

### Notas de preparação do Maxwell® CSC Genomic DNA Cartridge:



Os pingos de reagente ou de amostra retidos em qualquer parte do tabuleiro da plataforma deverão ser limpos com uma solução de água e detergente, seguida de um spray ou toalhete bactericida e em seguida, água. Não utilize lixívia em nenhum componente do instrumento.



### Adições do utilizador aos poços

1. Amostra lisada
3. 15 µl de Solução RNase A
8. Êmbolo CSC/RSC

**Figura 1. Maxwell® CSC Cartridge.** A amostra lisada é adicionada ao poço n.º 1, 15 µl de Solução de RNase A são adicionados ao poço n.º 3 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.



**Figura 2. Instalação e configuração do(s) tabuleiro(s) de plataforma.** O tampão de eluição é adicionado aos tubos de eluição, conforme indicado. O tabuleiro da plataforma é de Maxwell® CSC Instrument (Cat.# AS6000).

## 6. Execução do Maxwell® Instrument

Para informações detalhadas, consulte o Manual Técnico específico do seu Maxwell® CSC Instrument. Consulte a Tabela 1.

1. Ligue o Maxwell® Instrument e o Tablet PC. Inicie a sessão no Tablet PC e inicie o software Maxwell® IVD Mode tocando duas vezes no ícone no ambiente de trabalho. O instrumento executa uma auto-verificação e coloca todas as peças móveis na respetiva posição inicial.
2. Toque em **Iniciar** no ecrã Página Inicial.
3. Digitalize ou introduza o código de barras do canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC Genomic DNA Kit e prima **OK** para selecionar automaticamente o método a executar (Figura 3).

**Nota:** o código de barras do método do Maxwell® CSC Genomic DNA Kit é necessário para a purificação de DNA no Maxwell® CSC Instruments. A etiqueta do kit contém dois códigos de barras. O código de barras do método é indicado na Figura 3. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, p caso o código de barras não possa ser digitalizado.



**Figura 3. Etiqueta do kit que indica o código de barras a digitalizar.** O código de barras a digitalizar para iniciar uma purificação é apresentado na caixa vermelha, na parte superior direita da etiqueta do kit.

4. No ecrã de "Configuração do cartucho", confirme que o método do Maxwell® CSC Genomic DNA é apresentado no topo do ecrã. Toque nas posições do cartucho para selecionar ou anular a seleção de qualquer posição a utilizar para a execução da extração. Introduza qualquer informação de acompanhamento de amostra e prima o botão **Prosseguir** para continuar.

**Nota:** quando estiver a usar o Maxwell® CSC 48 Instrument, prima o botão **Anterior** ou **Posterior** para marcar ou desmarcar as posições dos cartuchos para o tabuleiro de plataforma apropriado.

## 6. Execução do Maxwell® Instrument (continuação)

5. Depois de abrir a porta, confirme que todos os itens da Lista de Verificação de Extração foram realizados. Verifique se as amostras foram adicionadas ao poço n.º 1 dos cartuchos, se os cartuchos estão carregados no instrumento, se os tubos de eluição destapados estão presentes com tampão de eluição e se os êmbolos estão colocados no poço n.º 8. Transfira o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos preparados para a plataforma do Maxwell® Instrument.

**Inserir o(s) tabuleiro(s) da plataforma Maxwell®:** segure o tabuleiro da plataforma de ambos os lados para evitar que os cartuchos saiam dos respectivos encaixes no tabuleiro da plataforma. Certifique-se de que o tabuleiro da plataforma é colocado no Maxwell® Instrument com os tubos de eluição próximos da porta. Posicione o ângulo da parte posterior do tabuleiro da plataforma para baixo e coloque no instrumento de maneira a que a parte posterior do tabuleiro da plataforma fique apoiada na parte posterior da plataforma do instrumento. Pressione a parte dianteira do tabuleiro da plataforma para baixo para assentar o tabuleiro da plataforma na plataforma de instrumentos. Se tiver dificuldade em encaixar o tabuleiro da plataforma na plataforma, verifique se o tabuleiro da plataforma está na orientação correta. Assegure-se de que o tabuleiro da plataforma se encontra nivelado com a plataforma de instrumentos e totalmente assente.

**Nota:** verifique o identificador nas bandejas de convés Maxwell® de 24 posições para determinar se devem ser colocadas na frente ou atrás do instrumento.

6. Toque no botão **Iniciar** para iniciar o ciclo de purificação. A plataforma vai retrair e a porta vai fechar.



**Aviso:** perigo de entalamento.

**Nota:** se utilizar o Maxwell® Instrument de 48 posições e o Sistema de Visão tiver sido ativado, os tabuleiros da plataforma serão digitalizados à medida que a plataforma se retrai. Quaisquer erros na configuração do tabuleiro de plataforma (por exemplo, êmbolos não presentes no poço n.º 8, tubos de eluição não presentes e abertos) irão causar o software regressar ao ecrã "Configuração do cartucho" e as posições problemáticas serão marcadas com um ponto de exclamação num círculo vermelho. Toque no ponto de exclamação para obter uma descrição do erro e resolver todos os estados de erro. Toque no botão **Iniciar** novamente para repetir a digitalização para repetir a leitura do tabuleiro da plataforma e iniciar a extração.

7. O Maxwell® Instrument irá iniciar imediatamente a execução de purificação. O ecrã irá apresentar os passos que estão a ser realizados e o tempo aproximado restante na execução.

### Notas:

- Toque no botão **Abortar** para abandonar a execução. Todas as amostras de uma execução abortada serão perdidas.
  - Se a execução for abandonada antes da conclusão, poderá ser-lhe pedido para verificar se os êmbolos ainda estão carregados na barra do êmbolo. Se os êmbolos estão presentes na barra do êmbolo, deve desempenhar uma **Limpeza** quando pedido. Se os êmbolos não estão presentes na barra do êmbolo, pode escolher saltar a **Limpeza** quando pedido. As amostras serão perdidas.
8. Uma vez concluída a execução, a interface do utilizador irá apresentar uma mensagem que o método terminou.

## Fim da execução

9. Siga as instruções apresentadas no ecrã no final do método para abrir a porta. Verifique se os êmbolos se encontram no poço n.º 8 do cartucho, no final da execução. Se os êmbolos não forem removidos da barra de êmbolo, siga as instruções do Manual Técnico adequadas para o seu Maxwell® Instrument (ver Tabela 1) para desempenhar um processo de **Limpeza** para tentar descarregar os êmbolos.
10. Remova os tabuleiros da plataforma do instrumento imediatamente a seguir à execução para evitar a evaporação dos eluatos. Remova os tubos de eluição que contêm DNA e tape os tubos.

**Nota:** a seguir a um procedimento de execução automática, o(s) tabuleiro(s) da plataforma pode(m) estar quente(s). Para remover um tabuleiro da plataforma do instrumento, segure em ambos os lados do tabuleiro da plataforma.

Certifique-se de que as amostras foram removidas do instrumento antes de executar o protocolo de desinfeção UV, para evitar danificar o ácido nucleico purificado.

11. Remova os cartuchos e os êmbolos do(s) tabuleiro(s) de plataforma Maxwell®. Elimine os resíduos perigosos de acordo com os procedimentos da sua instituição. Não reutilize os Maxwell® CSC Cartridges, os êmbolos CSC/RSC ou os tubos de eluição.



## 7. Pós-purificação

Determine se a colheita e a pureza da amostra de DNA purificado correspondem aos requisitos de introdução do ensaio de diagnóstico a jusante adequado antes da utilização nesse ensaio.



## 8. Avaliação do desempenho analítico

A avaliação do desempenho analítico foi realizada utilizando amostras humanas com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit e os Maxwell® CSC Instruments.

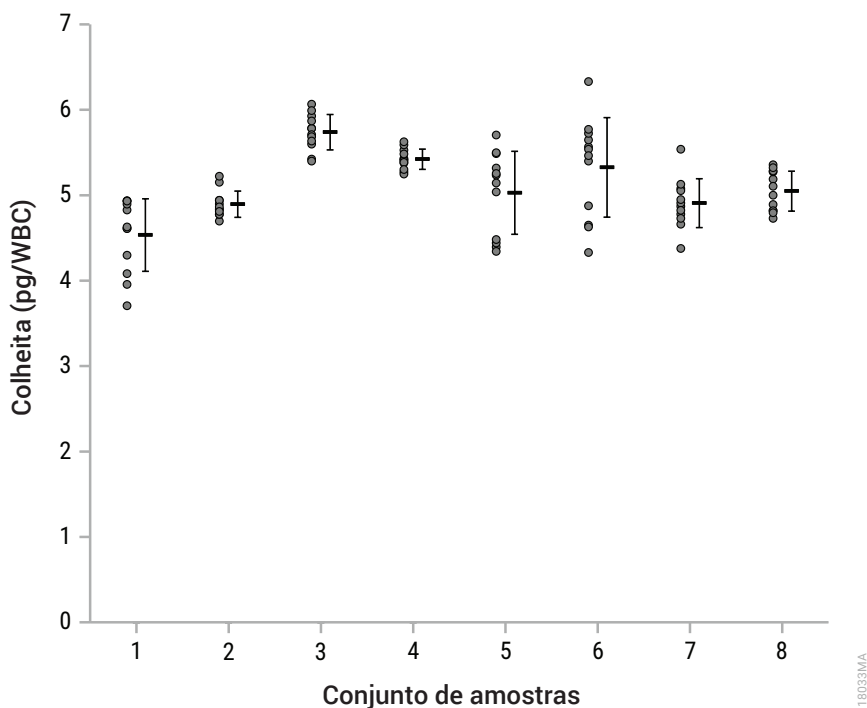
### 8.A. Colheita de DNA

A colheita de DNA foi avaliada utilizando DNA purificado com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit a partir de sangue total fresco e congelado em tubos de EDTA; sangue total congelado recolhido em tubos de citrato e heparina; amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de EDTA; amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de citrato e heparina; uma e duas zaragatoas bucais pré-processadas com uma coluna de compensação; tecidos do coração, pâncreas e cérebro; células de culturas de tecido; e aspirados de medula óssea congelados recolhidos em tubos de EDTA, citrato e heparina.

Os gráficos e tabela nesta secção representam a colheita de absorvância de cada replicado que foi purificado para cada tipo de amostra. Cada ponto nos gráficos representa uma medição individual à esquerda ao passo que a média com o desvio padrão se encontra à direita. Cada conjunto de dados inclui um total de 12 replicados, quatro replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC Instrument e oito replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC 48 Instrument.

As legendas das tabelas debaixo da figura descrevem as informações da amostra para cada conjunto de amostras apresentado nos gráficos associados.

## Sangue total

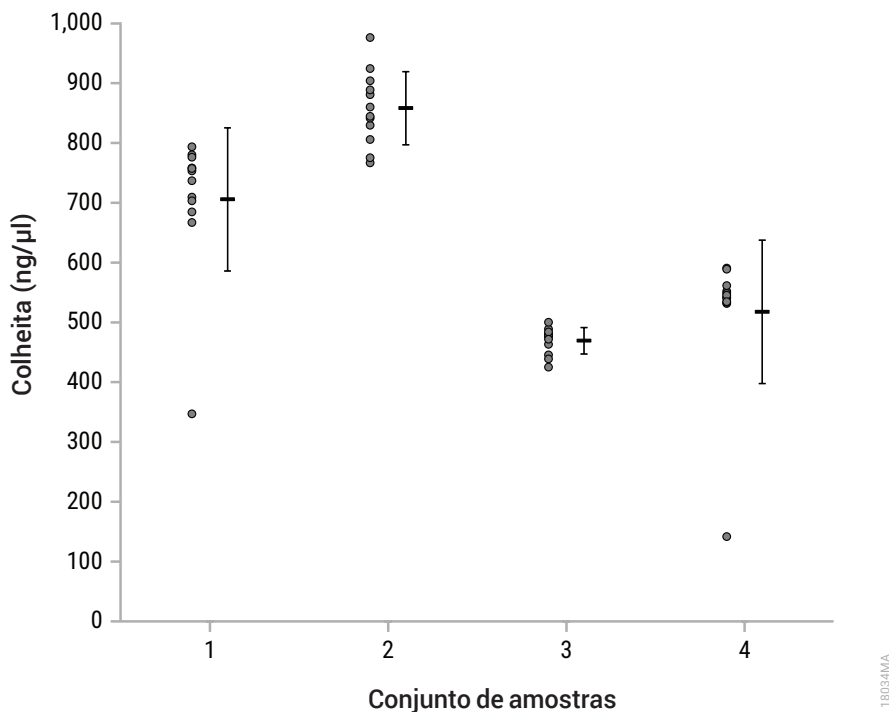


**Figura 4. Colheita de DNA de sangue total.** Para 300 µl de amostras de sangue total frescas e congeladas recolhidas em tubos de EDTA e amostras de sangue total congeladas recolhidas em tubos de citrato e heparina, as colheitas de DNA médias estavam no intervalo de 4,5–5,7 pg/WBC.

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução (µl)	Volume de eluição (µl)
1	EDTA	Congeladas	300	50
2	EDTA	Congeladas	300	200
3	EDTA	Frescas	300	50
4	EDTA	Frescas	300	200
5	Citrato	Congeladas	300	50
6	Citrato	Congeladas	300	200
7	Heparina	Congeladas	300	50
8	Heparina	Congeladas	300	200

## 8.A. Colheita de DNA (continuação)

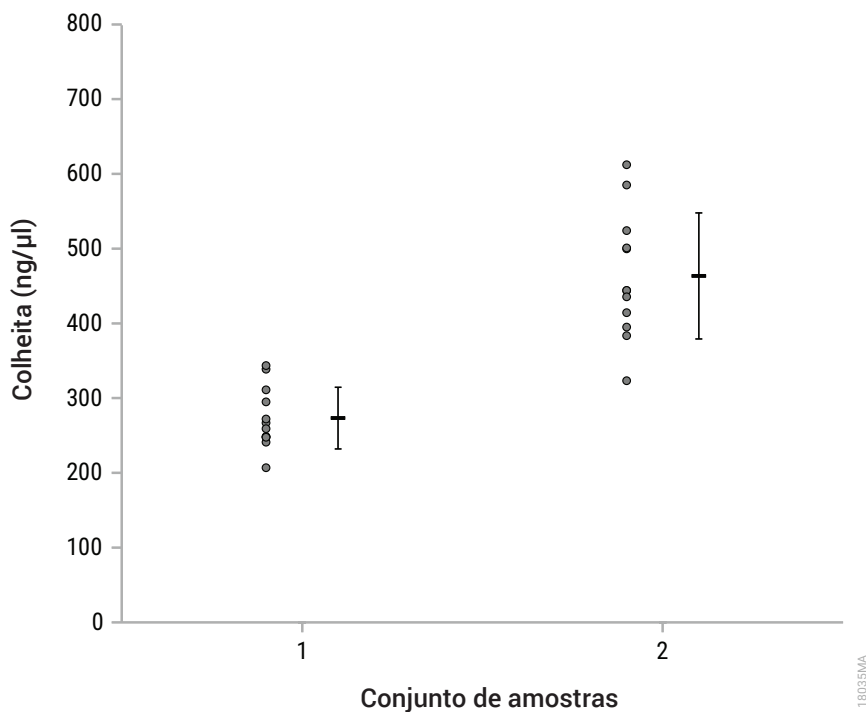
### Camada leuco-plaquetária



**Figura 5. Colheita de DNA da camada leuco-plaquetária.** Com um volume de introdução de amostra de 300 μl e um volume de eluição de 200 μl para amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhidas em tubos de EDTA e amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de citrato e heparina, as concentrações de DNA médias estavam no intervalo de 469,3–858,2 ng/μl.

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução (μl)	Volume de eluição (μl)
1	EDTA	Congeladas	300	200
2	EDTA	Frescas	300	200
3	Citrato	Congeladas	300	200
4	Heparina	Congeladas	300	200

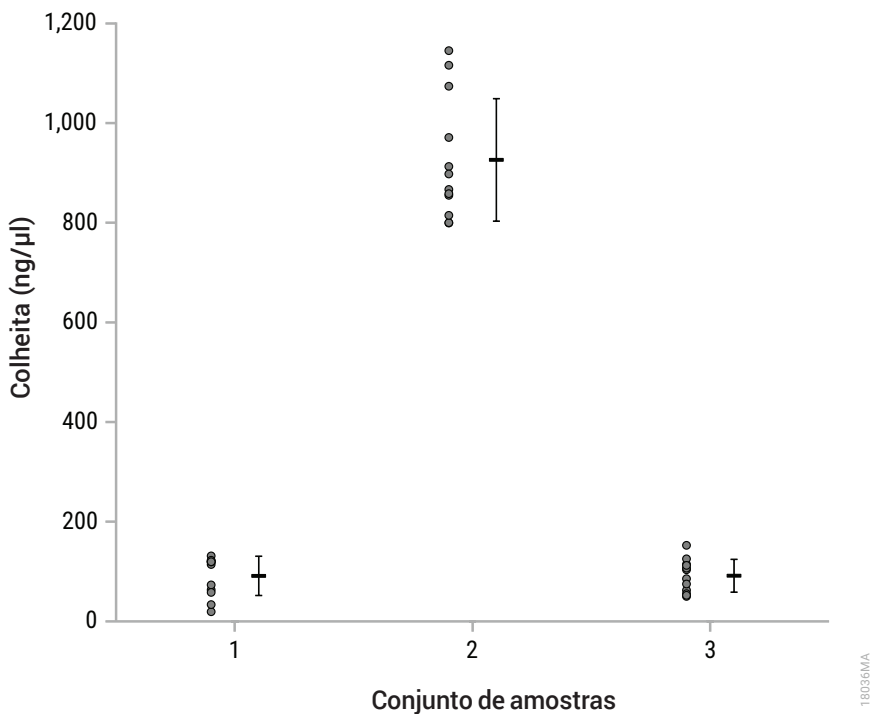
### Zaragatoa bucal



**Figura 6. Colheita de DNA de zaragatoa bucal.** Para uma e duas zaragoas bucais de introdução pré-processadas com uma coluna de compensação, as concentrações de DNA média estavam no intervalo de 273,2–463,5 ng/μl. O conjunto de amostras 1 refere-se a uma zaragatoa e o conjunto de amostras 2 refere-se a duas zaragoas. Foi utilizado um volume de eluição de 50 μl para todas as amostras.

## 8.A. Colheita de DNA (continuação)

### Tecido



**Figura 7. Colheita de DNA de tecido.** Para 50 mg de tecidos de coração, pâncreas e cérebro com um volume de eluição de 200 μl, as concentrações de DNA médias estavam no intervalo de 91,2–926,0 ng/μl. O conjunto de amostras 1 refere-se a tecido do coração, o conjunto de amostras 2 refere-se ao tecido do pâncreas e o conjunto de amostras 3 refere-se a tecido do cérebro.

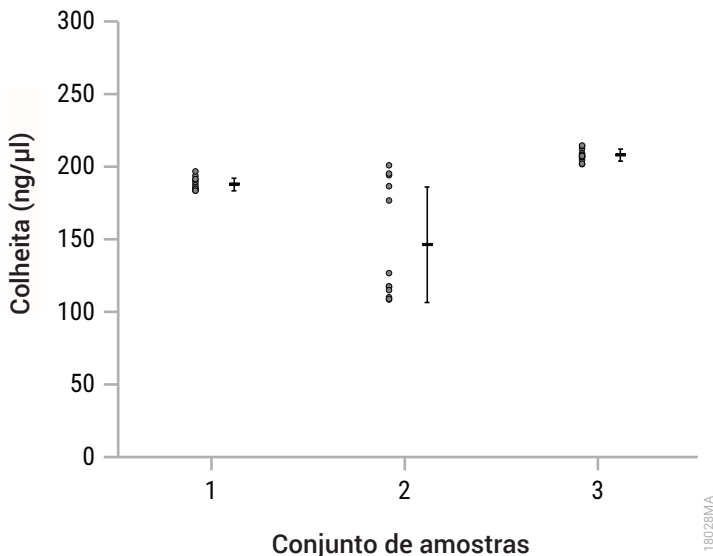
## Células

Para  $5 \times 10^6$  de células HEK293 de culturas de tecido com um volume de eluição de 200  $\mu\text{l}$ , a concentração de DNA média era de 550,2 ng/ $\mu\text{l}$ .

<b>Tipo de células</b>	<b>Número de células de introdução</b>	<b>Volume de eluição</b>	<b>Concentração (ng/<math>\mu\text{l}</math>)</b>
Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^6$	200 $\mu\text{l}$	523,4
			526,8
			536,1
			650,1
			481,6
			522,9
			530,4
			618,9
			546,5
			550,1
			569,9
545,4			
	<b>Média</b>	550,2	

## 8.A. Colheita de DNA (continuação)

### Medula óssea



**Figura 8. Colheita de DNA de medula óssea.** Para 300 μl de aspirados de medula óssea congelados recolhidos em tubos de EDTA, citrato e heparina e com um volume de eluição de 200 μl, as concentrações de DNA médias estavam no intervalo de 146,3–207,8 ng/μl. O conjunto de amostras 1 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de EDTA, o conjunto de amostras 2 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de citrato, e conjunto de amostras 3 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de heparina.

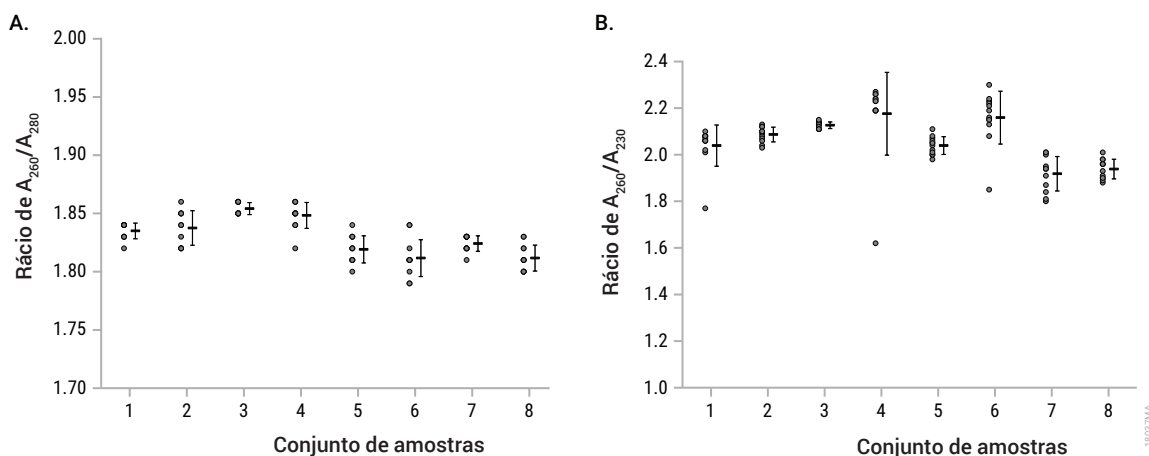
## 8.B. Qualidade de DNA (Pureza)

As purezas de DNA foram avaliadas utilizando DNA purificado com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit a partir de sangue total fresco e congelado em tubos de EDTA; sangue total congelado recolhido em tubos de citrato e heparina; amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de EDTA; amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de citrato e heparina; uma e duas zaragoatas bucais pré-processadas com uma coluna de compensação; tecidos do coração, pâncreas e cérebro; células de culturas de tecido; e aspirados de medula óssea congelados recolhidos em tubos de EDTA, citrato e heparina.

Os gráficos e tabela nesta secção representam os rácios de pureza  $A_{260}/A_{280}$  e  $A_{260}/A_{230}$  de absorvância de cada replicado que foi purificado para cada tipo de amostra. Cada ponto nos gráficos representa uma medição individual à esquerda do passo que a média com o desvio padrão se encontra à direita. Cada conjunto de dados inclui um total de 12 replicados, quatro replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC Instrument e oito replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC 48 Instrument.

As legendas das tabelas debaixo da figura descrevem as informações da amostra para cada conjunto de amostras apresentado nos gráficos associados.

### Sangue total

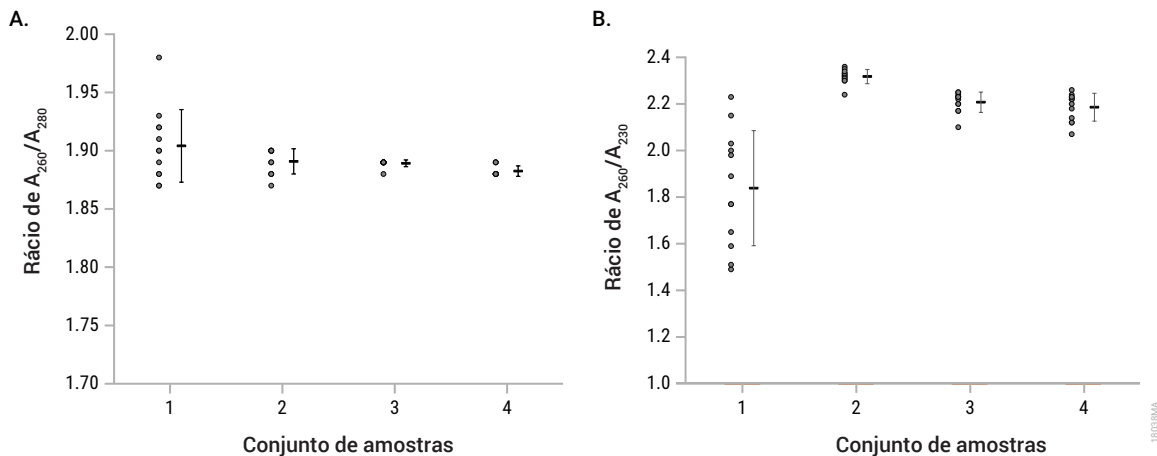


**Figura 9. Qualidade de DNA de sangue total.** Para 300  $\mu$ l de amostras de sangue total frescas e congeladas recolhidas em tubos de EDTA e amostras de sangue total congeladas recolhidas em tubos de citrato e heparina, os rácios de  $A_{260}/A_{280}$  médios estavam no intervalo de 1,8–1,9 (**Painel A**) e os rácios de  $A_{260}/A_{230}$  médios estavam no intervalo de 1,9–2,2 (**Painel B**).

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução ( $\mu$ l)	Volume de eluição ( $\mu$ l)
1	EDTA	Congeladas	300	50
2	EDTA	Congeladas	300	200
3	EDTA	Frescas	300	50
4	EDTA	Frescas	300	200
5	Citrato	Congeladas	300	50
6	Citrato	Congeladas	300	200
7	Heparina	Congeladas	300	50
8	Heparina	Congeladas	300	200

## 8.B. Qualidade de DNA (Pureza; continuação)

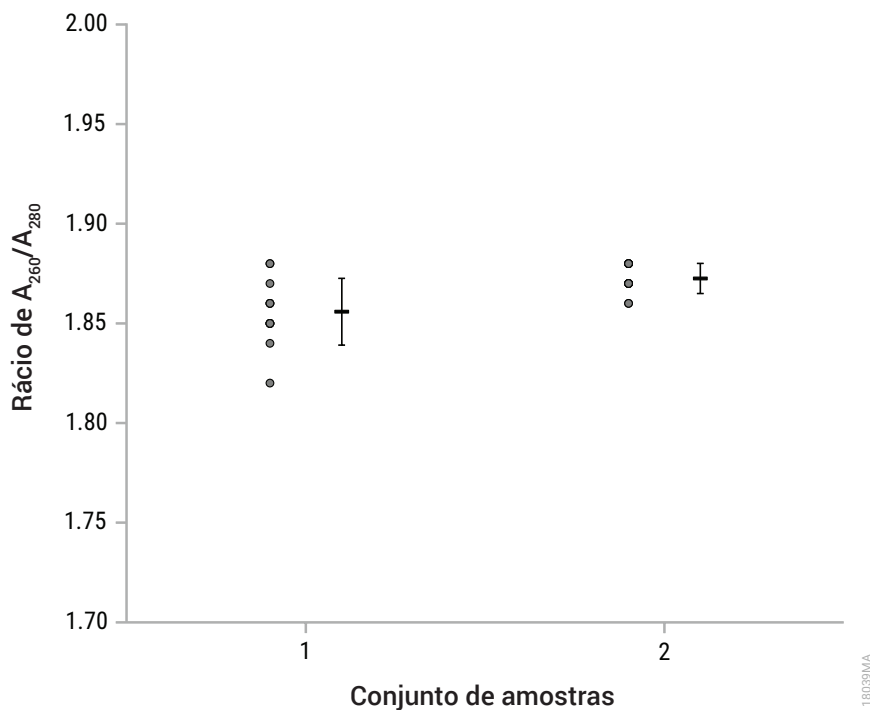
### Camada leuco-plaquetária



**Figura 10. Qualidade de DNA da camada leuco-plaquetária.** Com um volume de introdução de amostra de 300  $\mu$ l e um volume de eluição de 200  $\mu$ l para amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhidas em tubos de EDTA e amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de citrato e heparina, os raios de  $A_{260}/A_{280}$  médios eram de cerca de 1,9 (**Painel A**) e os raios de  $A_{260}/A_{230}$  médios estavam no intervalo de 1,8–2,3 (**Painel B**).

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução ( $\mu$ l)	Volume de eluição ( $\mu$ l)
1	EDTA	Congeladas	300	200
2	EDTA	Frescas	300	200
3	Citrato	Congeladas	300	200
4	Heparina	Congeladas	300	200

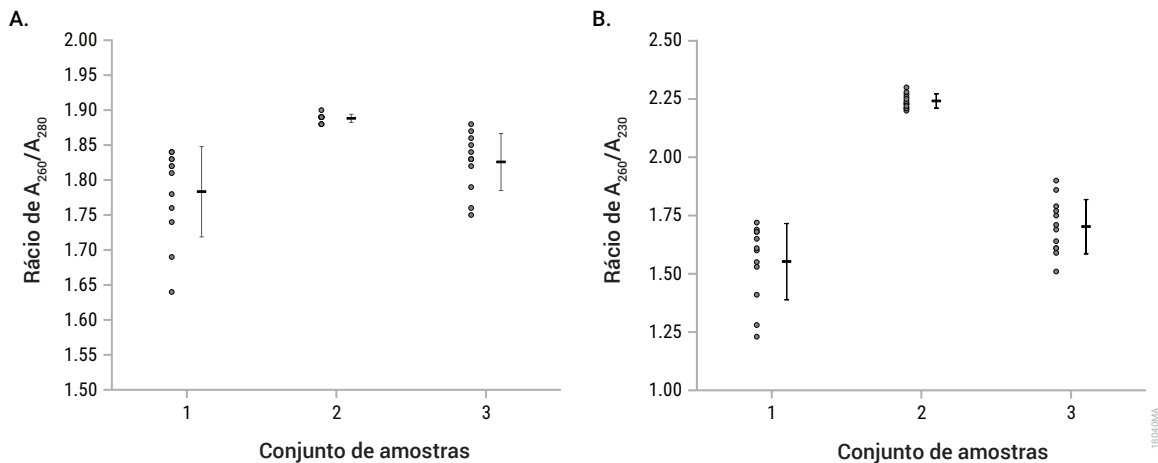
## Zaragatoa bucal



**Figura 11. Qualidade de DNA de zaragatoa bucal.** Para uma e duas zaragatoas bucais de introdução pré-processadas com uma coluna de compensação e com um volume de eluição de 50  $\mu$ l, os rácios de  $A_{260}/A_{280}$  médios estavam no intervalo de 1,8–1,9. No gráfico, o conjunto de amostras 1 refere-se a uma zaragatoa e o conjunto de amostras 2 refere-se a duas zaragatoas.

## 8.B. Qualidade de DNA (Pureza; continuação)

### Tecido



**Figura 12. Qualidade de DNA de tecido.** Para 50 mg de tecidos do coração, pâncreas e cérebro com um volume de eluição 200  $\mu$ l, os rácios de  $A_{260}/A_{280}$  médios estavam no intervalo de 1,7–1,9 (**Painel A**) e os rácios de  $A_{260}/A_{230}$  médios estavam no intervalo de 1,5–2,3 (**Painel B**). No gráfico, o conjunto de amostras 1 refere-se a tecido do coração, o conjunto de amostras 2 refere-se ao tecido do pâncreas e o conjunto de amostras 3 refere-se a tecido do cérebro.

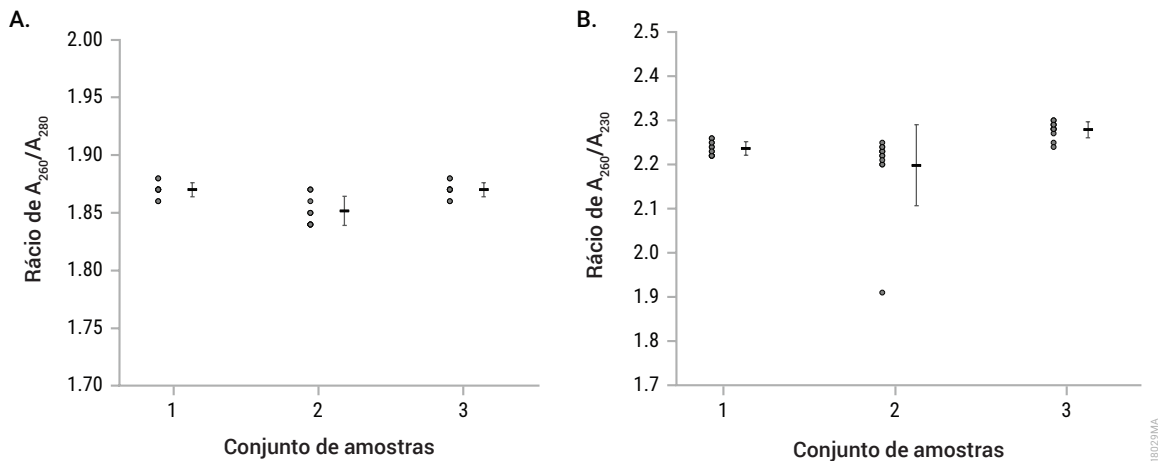
## Células

Para  $5 \times 10^6$  de células HEK293 de culturas de tecido com um volume de eluição de 200  $\mu$ l, o rácio de  $A_{260}/A_{280}$  médio era de 1,9 e o rácio de  $A_{260}/A_{230}$  médio de 2,3.

<b>Tipo de células</b>	<b>Número de células de introdução</b>	<b>Volume de eluição</b>	<b><math>A_{260}/A_{280}</math></b>	<b><math>A_{260}/A_{230}</math></b>
Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^6$	200 $\mu$ l	1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,2
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
			1,9	2,3
		<b>Média</b>	1,9	2,3

## 8.B. Qualidade de DNA (Pureza; continuação)

### Medula óssea



**Figura 13. Qualidade de DNA de medula óssea.** Para 300 µl de aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de EDTA, citrato e heparina e com um volume de eluição de 200 µl, os rácios de  $A_{260}/A_{280}$  médios estavam no intervalo de 1,8–1,9 (**Painel A**) e os rácios de  $A_{260}/A_{230}$  médios estavam no intervalo de 2,2–2,3 (**Painel B**). No gráfico, o conjunto de amostras 1 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de EDTA, o conjunto de amostras 2 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de citrato, e conjunto de amostras 3 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de heparina.

## 8.C. Reprodutibilidade

Para avaliar a precisão na purificação de DNA dentro de cada ciclo de extração, o DNA foi purificado a partir de oito replicados de 300 µl de uma amostra de sangue total humano única durante três execuções do instrumento com o Instrumento 1 e quatro replicados de 300 µl de uma amostra de sangue total humano única durante três execuções do instrumento com o Instrumento 2. A colheita de DNA foi quantificada pela absorvância e o coeficiente de variação (CV percentual) foi calculado depois para cada uma das três execuções de cada instrumento. A colheita de DNA com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit era reprodutível dentro de cada execução, com CV percentuais intra-execução no intervalo de 6–9% para o Instrumento 1 e os CV percentuais intra-execução no intervalo de 5–12% para o Instrumento 2.

Para determinar a precisão na purificação de DNA entre ciclos de extração, o DNA foi purificado a partir de oito replicados de 300 µl de uma amostra de sangue total humano única durante três execuções do instrumento com o Instrumento 1 e quatro replicados de 300 µl de uma amostra de sangue total humano única durante três execuções do instrumento com o Instrumento 2. A colheita de DNA foi quantificada pela absorvância e o coeficiente de variação (CV percentual) foi calculado depois para todas as amostras de todas as três execuções de cada instrumento. A colheita de DNA com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit era reprodutível através de execuções, com CV inter-execução de 7% para o Instrumento 1 e um CV inter-execução de 8% para o Instrumento 2.

<b>Instrumento</b>	<b>N.º da execução</b>	<b>CV percentual intra-execução</b>	<b>CV percentual inter-execução</b>
1	1 (n = 8)	9%	7%
	2 (n = 8)	7%	
	3 (n = 8)	6%	
2	1 (n = 4)	12%	8%
	2 (n = 4)	7%	
	3 (n = 4)	5%	

#### **8.D. Amplificabilidade**

A compatibilidade com a amplificação a jusante foi avaliada utilizando DNA purificado a partir de sangue total fresco e congelado em tubos de EDTA; sangue total congelado recolhido em tubos de citrato e heparina; amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de EDTA; amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de citrato e heparina; 1 e 2 zaragatoas bucais com e sem pré-processamento com uma coluna de compensação; tecidos do coração, pâncreas e cérebro; células de culturas de tecido; líquido amniótico; urina; PBMC; e aspirados de medula óssea congelados recolhidos em tubos de EDTA, citrato e heparina com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit.

Foram realizadas purificações de DNA para cada tipo de amostra com as quantidades de introdução de amostra mais elevadas e mais baixas e os volumes de eluição mais elevados e mais baixos para cada tipo de amostra. As células de culturas de tecido e PBMC também incluíram uma série de diluição do número de células.

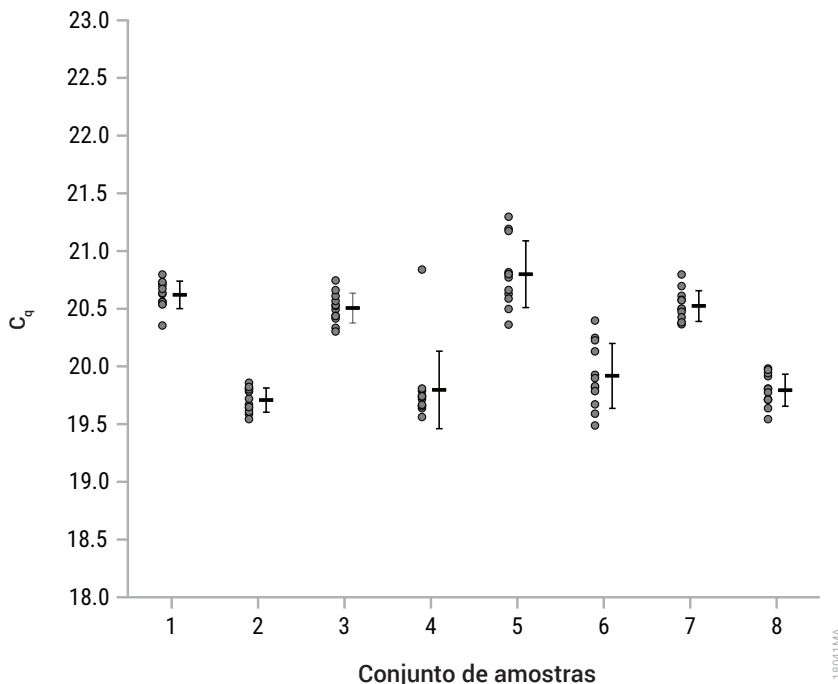
O DNA resultante de todas as amostras foi quantificado por absorvância, diluído até uma concentração dentro da curva padrão de qPCR e, posteriormente, amplificado com um ensaio de qPCR utilizando o alvo de 300 bp. O valor de  $C_q$  para cada amostra de DNA purificado e o valor de  $C_q$  médio para três replicados do padrão de DNA genómico de 0,0032 ng/µl fornecido com o ensaio de qPCR foram ambos relatados.

Os gráficos e tabela nesta secção representam os valores de  $C_q$  de cada replicado que foi purificado para cada tipo de amostra. Cada ponto nos gráficos representa uma medição individual à esquerda ao passo que a média com o desvio padrão se encontra à direita. Cada conjunto de dados inclui um total de 12 replicados, quatro replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC Instrument e oito replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC 48 Instrument.

As legendas das tabelas debaixo da figura descrevem as informações da amostra para cada conjunto de amostras apresentado nos gráficos associados.

## 8.D. Amplificabilidade (continuação)

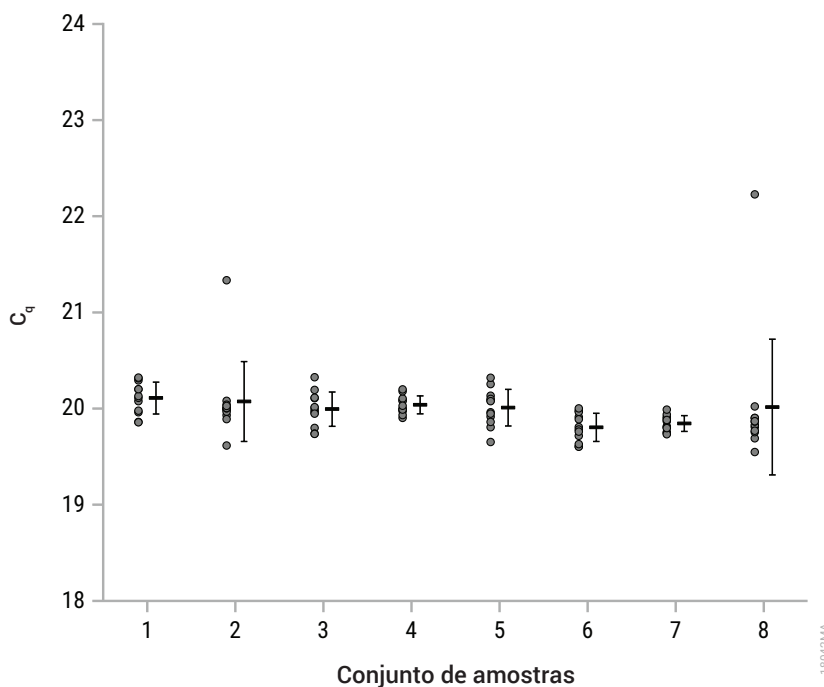
### Sangue total



**Figura 14. Amplificação de DNA de sangue total.** Para amostras de sangue total frescas e congeladas recolhidas em tubos de EDTA, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,54–20,80 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/µl (33,11 ciclos). Para amostras de sangue total congeladas recolhidas em tubos de citrato e heparina, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,49–21,30 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/µl (32,88 ciclos).

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução (µl)	Volume de eluição (µl)
1	EDTA	Congeladas	50	50
2	EDTA	Congeladas	300	200
3	EDTA	Frescas	50	50
4	EDTA	Frescas	300	200
5	Citrato	Congeladas	50	50
6	Citrato	Congeladas	300	200
7	Heparina	Congeladas	50	50
8	Heparina	Congeladas	300	200

## Camada leuco-plaquetária

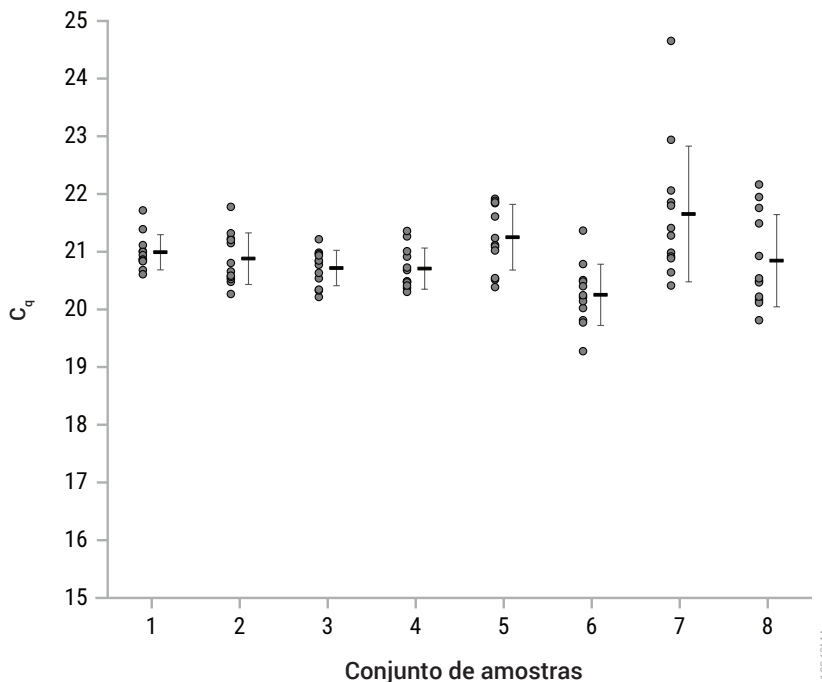


**Figura 15. Amplificação de DNA da camada leuco-plaquetária.** Para amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de EDTA, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,62–21,34 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (33,09 ciclos). Para amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de citrato e heparina, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,55–22,23 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (32,86 ciclos).

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução ( $\mu$ l)	Volume de eluição ( $\mu$ l)
1	EDTA	Congeladas	50	50
2	EDTA	Congeladas	300	200
3	EDTA	Frescas	50	50
4	EDTA	Frescas	300	200
5	Citrato	Congeladas	50	50
6	Citrato	Congeladas	300	200
7	Heparina	Congeladas	50	50
8	Heparina	Congeladas	300	200

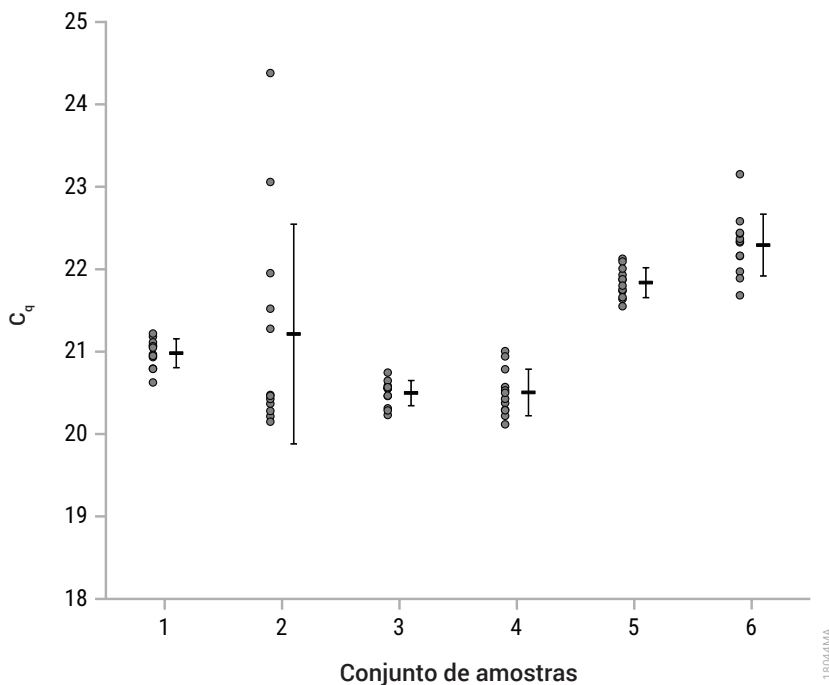
## 8.D. Amplificabilidade (continuação)

### Zaragatoa bucal



**Figura 16. Amplificação de DNA de zaragatoa bucal.** Para uma e duas zaragatoas bucais de introdução pré-processadas com uma coluna de compensação, os valores de  $C_q$  variaram entre 20,22–21,78 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/μl (32,45 ciclos). Para uma e duas zaragatoas bucais de introdução pré-processadas sem uma coluna de compensação, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,28–24,65 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/μl (32,54 ciclos).

Conjunto de amostras	Número de zaragatoa	Pré-processamento	Volume de eluição (μl)
1	1 zaragatoa	Com coluna de compensação	50
2	1 zaragatoa	Com coluna de compensação	200
3	2 zaragatoas	Com coluna de compensação	50
4	2 zaragatoas	Com coluna de compensação	200
5	1 zaragatoa	Sem coluna de compensação	50
6	1 zaragatoa	Sem coluna de compensação	200
7	2 zaragatoas	Sem coluna de compensação	50
8	2 zaragatoas	Sem coluna de compensação	200

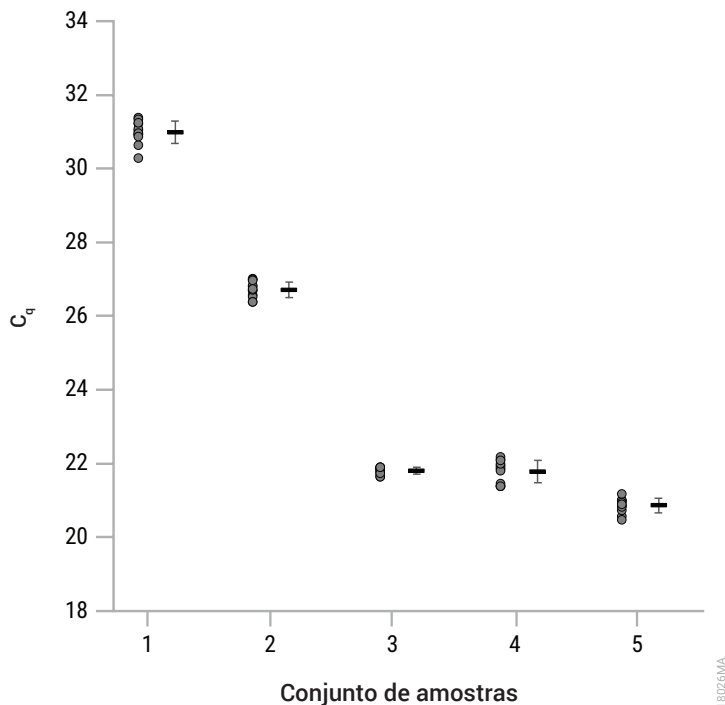
**Tecido**


**Figura 17. Amplificação de DNA de tecido.** Para amostras de tecidos do coração e pâncreas, os valores de  $C_q$  variaram entre 20,12–24,38 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (32,98 ciclos). Para amostras de tecidos do cérebro, os valores de  $C_q$  variaram entre 21,55–23,15 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (33,68 ciclos).

Conjunto de amostras	Tipo de tecido	Quantidade de introdução (mg)	Volume de eluição ( $\mu$ l)
1	Coração	5	50
2	Coração	50	200
3	Pâncreas	5	50
4	Pâncreas	50	200
5	Cérebro	5	50
6	Cérebro	50	200

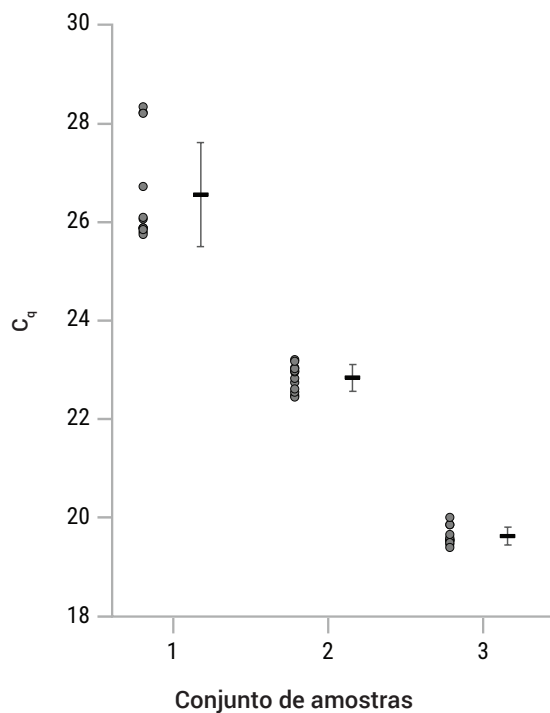
## 8.D. Amplificabilidade (continuação)

### Células



**Figura 18. Amplificação de DNA de células de culturas de tecido.** Para séries de diluição de células HEK293 de culturas de tecido, os valores de  $C_t$  variaram entre 20,48–31,38 ciclos, e todos estavam abaixo do valor de  $C_t$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (33,04 ciclos).

Conjunto de amostras	Tipo de células	Número de células	Volume de eluição ( $\mu$ l)
1	Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^2$	50
2	Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^3$	50
3	Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^4$	50
4	Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^5$	200
5	Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^6$	200



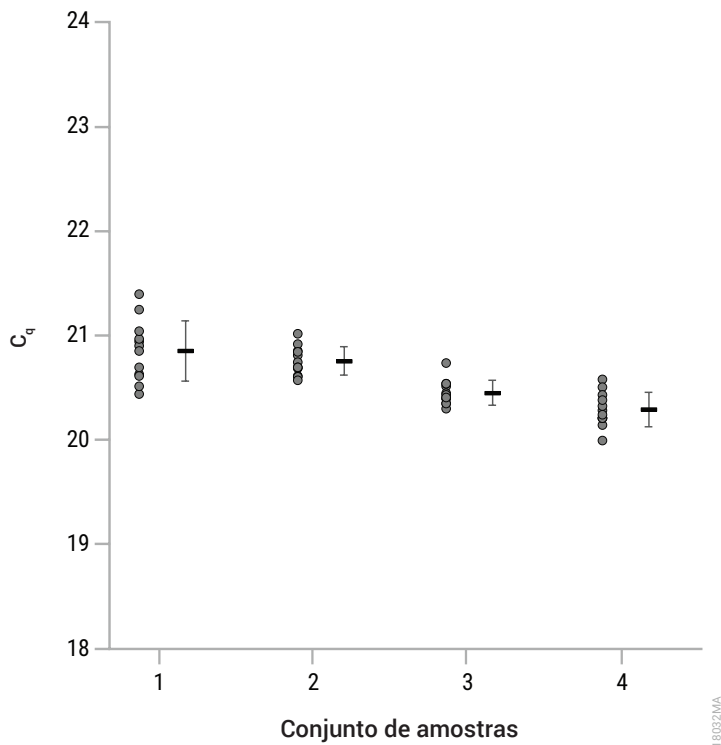
**Figura 19. Amplificação de DNA de PBMC.** Para séries de diluição de PBMC, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,40–28,33 ciclos, e todos estavam abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (32,80 ciclos).

**Conjunto de amostras**

Conjunto de amostras	Tipo de células	Número de células	Volume de eluição ( $\mu$ l)
1	PBMC	$5 \times 10^4$	50
2	PBMC	$5 \times 10^5$	100
3	PBMC	$5 \times 10^6$	200

## 8.D. Amplificabilidade (continuação)

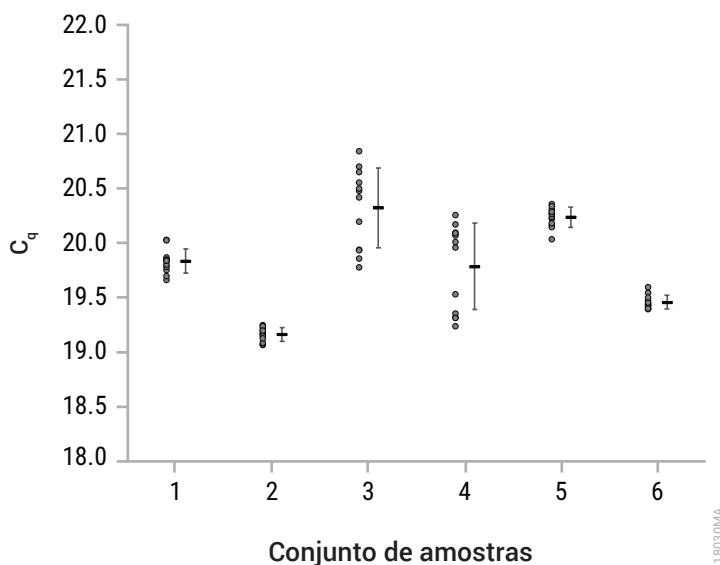
### Células (continuação)



**Figura 20. Amplificação de DNA de urina e líquido amniótico.** Para células obtidas de amostras de urina e líquido amniótico, os valores de  $C_q$  variaram entre 20,00–21,40 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/μl (32,71 ciclos).

Conjunto de amostras	Tipo de células	Volume de introdução (ml)	Volume de eluição (μl)
1	Urina	15	50
2	Urina	50	50
3	Líquido amniótico	1	50
4	Líquido amniótico	5	50

## Medula óssea



**Figura 21. Amplificação de DNA de medula óssea.** Para aspirados de medula óssea congelados recolhidos em tubos de EDTA e citrato, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,07–20,84 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (32,42 ciclos). Para aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de heparina, os valores de  $C_q$  variaram entre 19,40–20,36 ciclos, e todos estavam muito abaixo do valor de  $C_q$  médio para o padrão de DNA de 0,0032 ng/ $\mu$ l (32,82 ciclos).

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Volume de introdução ( $\mu$ l)	Volume de eluição ( $\mu$ l)
1	EDTA	50	50
2	EDTA	300	200
3	Citrato	50	50
4	Citrato	300	200
5	Heparina	50	50
6	Heparina	300	200

### **8.E. Inibição (Substâncias interferentes)**

A inibição da amplificação foi avaliada utilizando DNA purificado a partir de sangue total fresco e congelado em tubos de EDTA; sangue total congelado recolhido em tubos de citrato e heparina; amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de EDTA; amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhido em tubos de citrato e heparina; uma e duas zaragatoas bucais com e sem pré-processamento com uma coluna de compensação; tecidos do coração, pâncreas e cérebro; células de culturas de tecido; líquido amniótico; urina; PBMC; e aspirados de medula óssea congelados recolhidos em tubos de EDTA, citrato e heparina com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit.

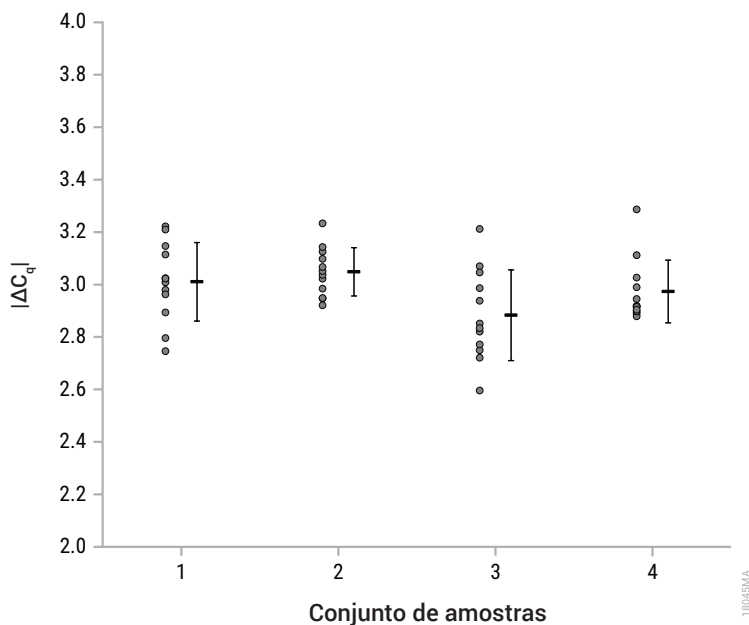
Foram realizadas purificações de DNA para cada tipo de amostra. As quantidades de introdução e volumes de eluição da amostra nos quais a menor quantidade de diluição seria necessária para as amostras serem utilizadas no qPCR foram avaliados nesta análise.

O DNA foi quantificado e diluído para uma concentração dentro da curva padrão de qPCR, e uma alíquota de cada DNA foi então diluída oito vezes adicionais. As diluições de DNA iniciais e as diluições por oito foram amplificadas utilizando um ensaio de qPCR. A diferença nos valores de  $C_q$  ( $|\Delta C_q|$ ) para a sequência alvo de 300 bp é relatada. Um  $|\Delta C_q|$  de  $3 \pm 1$  ciclos corresponde à ausência de inibição da amplificação do DNA devido a substâncias endógenas e exógenas que possam estar presentes nas amostras.

Os gráficos e tabela nesta secção representam o  $|\Delta C_q|$  de cada replicado que foi purificado para cada tipo de amostra. Cada ponto nos gráficos representa uma medição individual à esquerda ao passo que a média com o desvio padrão se encontra à direita. Cada conjunto de dados inclui um total de 12 replicados, quatro replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC Instrument e oito replicados purificados utilizando o Maxwell® CSC 48 Instrument.

As legendas das tabelas debaixo da figura descrevem as informações da amostra para cada conjunto de amostras apresentado nos gráficos associados.

## Sangue total

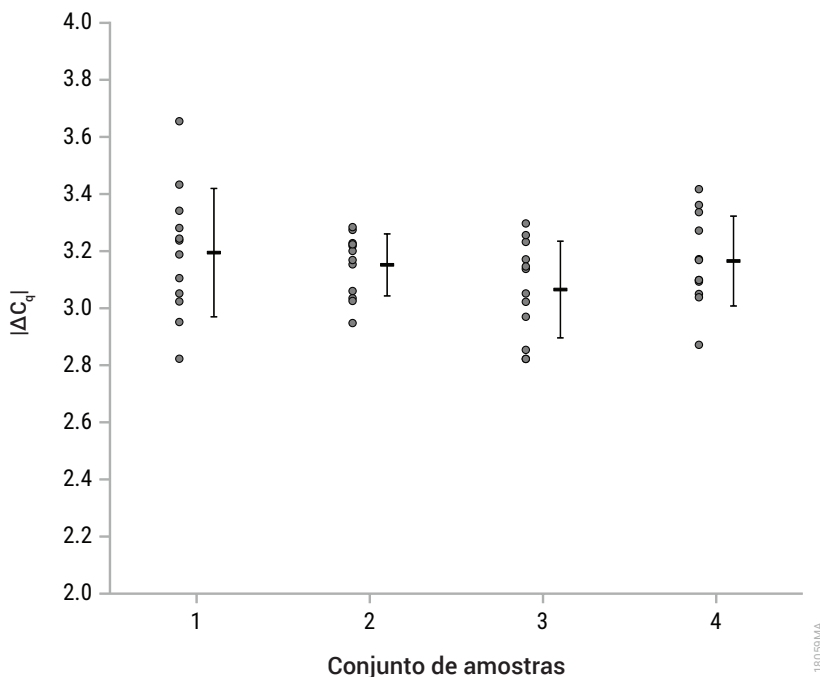


**Figura 22. Testar a inibição na amplificação de DNA de sangue total.** Para amostras de sangue total frescas e congeladas recolhidas em tubos de EDTA, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,75 ciclos e um valor elevado de 3,23 ciclos. Para amostras de sangue total congeladas recolhidas em tubos de citrato e heparina, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,60 ciclos e um valor elevado de 3,29 ciclos.

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução (µl)	Volume de eluição (µl)
1	EDTA	Congeladas	50	50
2	EDTA	Frescas	50	50
3	Citrato	Congeladas	50	50
4	Heparina	Congeladas	50	50

## 8.E. Inibição (Substâncias interferentes; continuação)

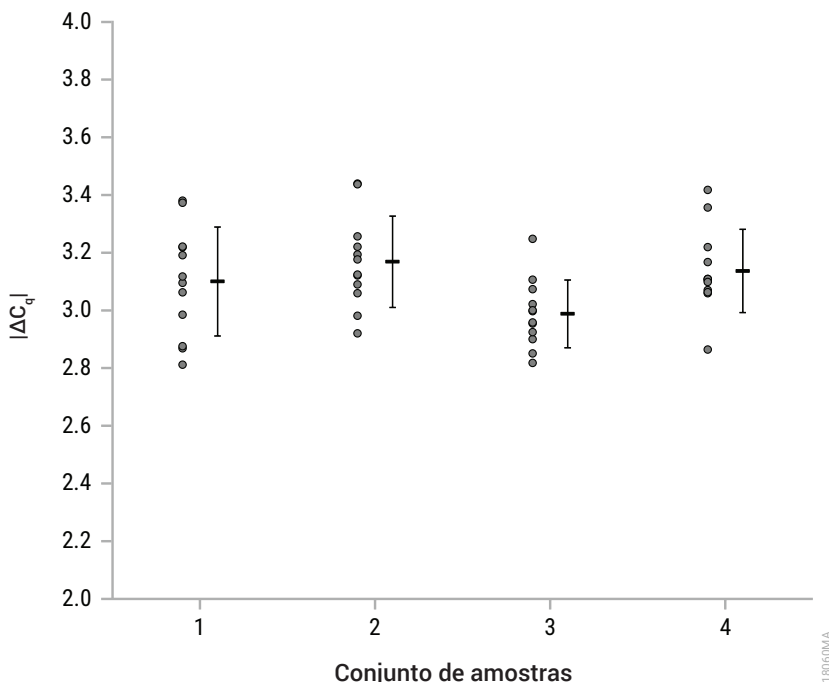
### Camada leuco-plaquetária



**Figura 23. Testar a inibição na amplificação de DNA da camada leuco-plaquetária.** Para amostras de camada leuco-plaquetária frescas e congeladas geradas a partir de sangue total recolhidas em tubos de EDTA, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,82 ciclos e um valor elevado de 3,65 ciclos. Para amostras de camada leuco-plaquetária congeladas geradas a partir de sangue total recolhidas em tubos de citrato e heparina, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,82 ciclos e um valor elevado de 3,42 ciclos.

Conjunto de amostras	Anticoagulante	Armazenamento	Volume de introdução (µl)	Volume de eluição (µl)
1	EDTA	Congeladas	50	50
2	EDTA	Frescas	50	50
3	Citrato	Congeladas	50	50
4	Heparina	Congeladas	50	50

## Zaragatoa bucal

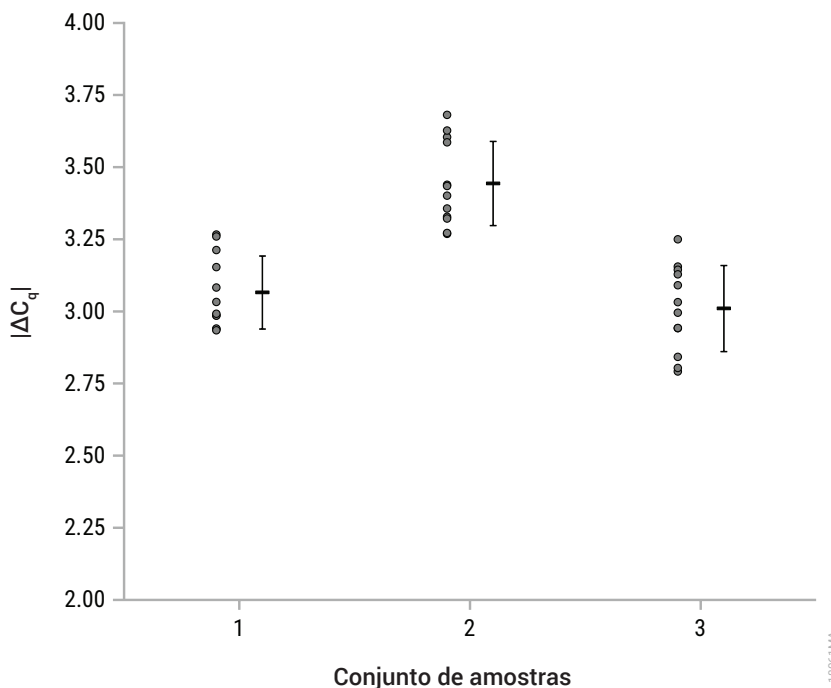


**Figura 24. Testar a inibição na amplificação de DNA da zaragatoa bucal.** Para uma e duas zaragatoas bucais de introdução pré-processadas com uma coluna de compensação, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,81 ciclos e um valor elevado de 3,44 ciclos. Para uma e duas zaragatoas bucais de introdução pré-processadas sem uma coluna de compensação, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,82 ciclos e um valor elevado de 3,42 ciclos.

Conjunto de amostras	Número de zaragatoa	Pré-processamento	Volume de eluição (µl)
1	1 zaragatoa	Com coluna de compensação	50
2	2 zaragatoas	Com coluna de compensação	50
3	1 zaragatoa	Sem coluna de compensação	50
4	2 zaragatoas	Sem coluna de compensação	50

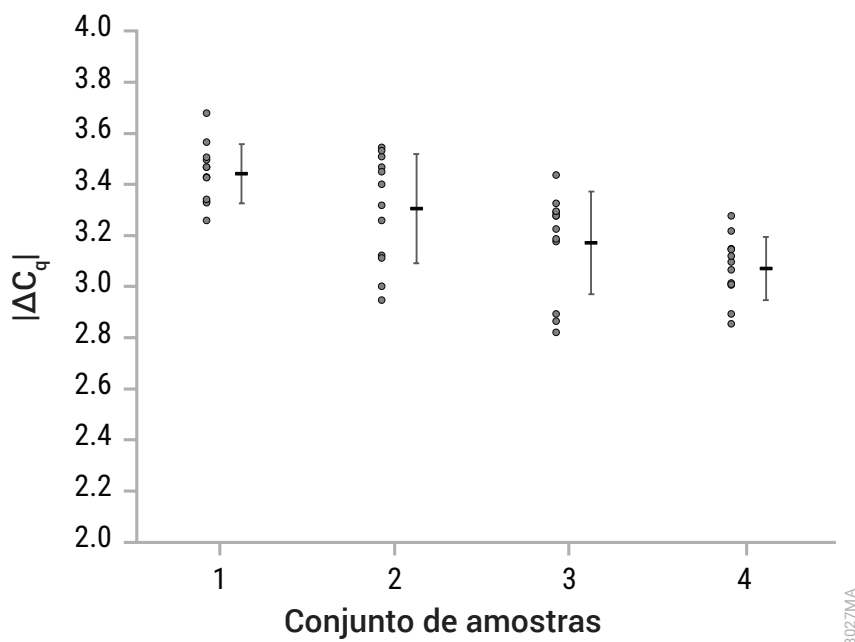
## 8.E. Inibição (Substâncias interferentes; continuação)

### Tecido



**Figura 25. Testar a inibição na amplificação de DNA do tecido.** Para 5 mg de tecidos do coração e pâncreas, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,93 ciclos e um valor elevado de 3,68 ciclos. Para 5 mg de tecidos do cérebro, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,79 ciclos e um valor elevado de 3,25 ciclos. Foi utilizado um volume de eluição de 50  $\mu$ l para todas as amostras. No gráfico, o conjunto de amostras 1 refere-se a tecido do coração, o conjunto de amostras 2 refere-se ao tecido do pâncreas e o conjunto de amostras 3 refere-se a tecido do cérebro.

## Células

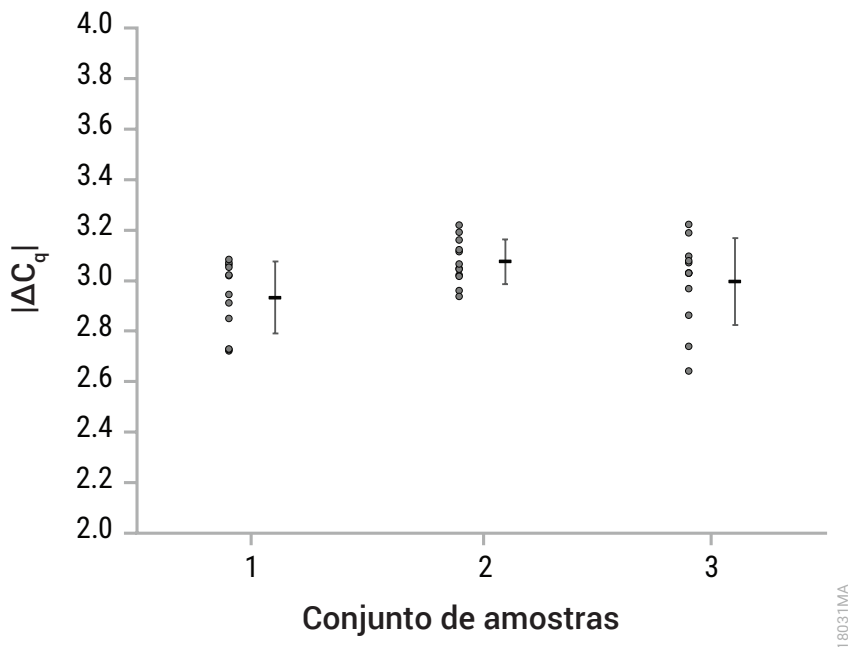


**Figura 26. Testar a inibição na amplificação de DNA das células.** Para  $5 \times 10^4$  de células HEK293 de culturas de tecido com um volume de eluição de 50  $\mu$ l, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 3,26 ciclos e um valor elevado de 3,68 ciclos. Para  $5 \times 10^5$  PBMC com um volume de eluição de 100  $\mu$ l, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,95 ciclos e um valor elevado de 3,55 ciclos. Para células obtidas de amostras de 50 ml de urina e de 5 ml de líquido amniótico com um volume de eluição de 50  $\mu$ l, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,82 ciclos e um valor elevado de 3,44 ciclos.

Conjunto de amostras	Tipo de células	Quantidade de introdução	Volume de eluição (μl)
1	Células HEK293 de culturas de tecido	$5 \times 10^4$ células	50
2	PBMC	$5 \times 10^5$ células	100
3	Urina	50 ml	50
4	Líquido amniótico	5 ml	50

## 8.E. Inibição (Substâncias interferentes; continuação)

### Medula óssea



**Figura 27. Testar a inibição na amplificação de DNA de medula óssea.** Para 50 µl de aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de EDTA e citrato, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,72 ciclos e um valor elevado de 3,22 ciclos. Para 50 µl de aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de heparina, os valores de  $|\Delta C_q|$  variaram entre um valor baixo de 2,64 ciclos e um valor elevado de 3,22 ciclos. Foi utilizado um volume de eluição de 50 µl para todas as amostras. No gráfico, o conjunto de amostras 1 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de EDTA, o conjunto de amostras 2 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de citrato, e conjunto de amostras 3 refere-se a aspirados de medula óssea recolhidos em tubos de heparina.

## 8.F. Contaminação cruzada

As amostras de camada leuco-plaquetária masculinas (300 µl) e femininas (50 µl) foram processadas em posições alternadas na plataforma dos instrumentos Maxwell®, e as amostras de DNA purificado feminino resultantes foram amplificadas utilizando um alvo de DNA cromossômico Y com um ensaio de qPCR. A presença deste alvo cromossômico Y nas amostras femininas foi utilizada para identificar potencial contaminação cruzada de amostras próximas. Quando as amostras de camada leuco-plaquetária foram processadas em posições na plataforma adjacentes a amostras de camada leuco-plaquetária masculinas, nenhuma das amostras de DNA feminino exibiu um valor de  $C_q$  para o alvo de DNA cromossômico Y.

## **9. Avaliação do desempenho clínico**

A avaliação do desempenho clínico foi realizada utilizando amostras humanas com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit e o Maxwell® CSC 48 Instrument.

### **Sangue total**

Dois dispositivos de teste de um laboratório externo purificaram o DNA de 200 µl de amostras de sangue total humano com um volume de eluição de 100 µl de 12 doadores individuais com o sistema de purificação Maxwell® CSC bem como um método de extração de referência laboratorial. Os eluatos resultantes foram analisados pela amplificação do gene de referência HCP5 de controlo positivo no ensaio HLA-B27. Todas as 12 amostras de DNA purificadas com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit demonstraram uma concordância entre os dois dispositivos de teste e o método de extração de referência laboratorial.

### **Zaragatoa bucal**

Um dispositivo de teste de um laboratório externo purificou o DNA de uma amostra de zaragatoa bucal humana pré-processada com uma coluna de compensação e um volume de eluição de 100 µl de 12 doadores individuais com o sistema de purificação Maxwell® CSC bem como um método de extração de referência laboratorial. Os eluatos resultantes foram analisados pela amplificação do gene de referência HCP5 de controlo positivo no ensaio HLA-B27. Todas as 12 amostras de DNA purificadas com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit demonstraram uma concordância com o método de extração de referência laboratorial.

### **Tecido**

Um dispositivo de teste de um laboratório externo purificou o DNA de 10–25 mg de amostras de tecido humano com um volume de eluição de 200 µl de 12 doadores individuais com o sistema de purificação Maxwell® CSC bem como um método de extração de referência laboratorial. Os eluatos resultantes foram analisados pela amplificação do gene de referência HCP5 de controlo positivo no ensaio HLA-B27. Todas as 12 amostras de DNA purificadas com o Maxwell® CSC Genomic DNA Kit demonstraram uma concordância com o método de extração de referência laboratorial.

## 10. Resolução de Problemas

Contacte a filial ou o distribuidor local da Promega para obter resposta a questões não abordadas neste manual. As informações de contacto estão disponíveis em: **www.promega.com**. E-mail: **techserv@promega.com**

### Sintomas

### Causas e observações

Concentração de DNA mais baixa do que a esperada

Amostras que tenham sido submetidas a diversos ciclos de congelamento/descongelamento pode apresentar DNA degradado. As diretrizes relativas à recolha e armazenamento de amostras encontram-se listadas para cada tipo de amostra específico.

A amostra continha uma baixa quantidade de DNA genómico. A colheita de DNA genómico depende da quantidade da amostra a processar e do conteúdo de DNA dessa amostra.

Não foi adicionada solução de proteinase K, foi adicionado um volume incompleto de solução de proteinase K ou a proteinase K não foi eficazmente misturada com a amostra. A lise e colheita dependem da extração completa com a proteinase K.

A amostra de introdução não foi misturada antes do processamento. Certifique-se de que mistura as amostras antes de processar.

O volume de eluição utilizado na extração era demasiado grande para a amostra a processar. Para aumentar a concentração de DNA eluída, reduza o volume de tampão de eluição inicial.

Foi processada demasiada amostra ou amostra contendo uma quantidade excessiva de DNA genómico. Amostra ou DNA genómico em quantidade excessiva pode causar uma falha da química de extração, resultando numa concentração de eluato que não se correlacionam com a quantidade de amostra a processar.

O lisato não foi misturado com a solução de ligação no poço n.º 1 aspirando e dispensado 5–10 vezes após a transferência para fazer uma mistura homogénea. A não criação de uma mistura homogénea do lisato da amostra e solução de ligação no poço n.º 1 pode resultar em colheita e pureza diminuídas no eluato final.

As amostras não foram misturadas apropriadamente ou nos passos corretos durante o processamento. A não mistura adequada dos reagentes e amostras em conjunto no tubo de incubação pode afetar o desempenho.

**Sintomas****Causas e observações**

Concentração de DNA mais baixa do que a esperada (continuação)

O tampão de lise e o Intensificador Lítico (LE2) foram utilizados indistintamente no passo incorreto ou com o volume incorreto. Reprocesse as amostras, utilizando corretamente o tampão de lise o Intensificador Lítico (LE2) conforme indicado.

Pureza mais baixa do que a esperada

Não foi adicionada solução de proteinase K, foi adicionado um volume incompleto de solução de proteinase K ou a proteinase K não foi eficazmente misturada com a amostra. A lise e colheita dependem da extração completa com a proteinase K.

O lisato não foi misturado com a solução de ligação no poço n.º 1 aspirando e dispensado 5–10 vezes após a transferência para fazer uma mistura homogênea. A não criação de uma mistura homogênea do lisato da amostra e solução de ligação no poço n.º 1 pode resultar em colheita e pureza diminuídas no eluato final.

Amostras que tenham sido submetidas a diversos ciclos de congelamento/descongelamento pode apresentar DNA degradado. Utilize amostras que tenham sido recolhidas e armazenadas em conformidade com as diretrizes listadas sob cada tipo de amostra específico.

No caso de amostras de sangue total, camada leuco-plaquetária e medula óssea, transferir material coagulado ou gorduroso para o tubo de incubação pode resultar numa lise da amostra fraca. Transfira apenas amostras líquidas para fins de purificação.

O tampão de lise e o Intensificador Lítico (LE2) foram utilizados indistintamente no passo incorreto ou com o volume incorreto. Reprocesse as amostras, utilizando corretamente o tampão de lise o Intensificador Lítico (LE2) conforme indicado.

Alguns tipos de tecido podem produzir valores de pureza inferiores aos esperados. Se forem pretendidos valores de pureza superiores, reduza a quantidade de introdução do tecido a processar.

As amostras não foram misturadas apropriadamente ou nos passos corretos durante o processamento. A não mistura adequada dos reagentes e amostras em conjunto no tubo de incubação pode afetar o desempenho.

## 10. Resolução de problemas (continuação)

<b>Sintomas</b>	<b>Causas e observações</b>
Pureza mais baixa do que a esperada (continuação)	Transferir material sólido para o poço n.º 1 do cartucho pode resultar na copurificação do material sólido e dos contaminantes. Remova o material sólido antes de transferir a amostra lisada para o cartucho.
Contaminação de RNA	A Solução de RNase A não foi adicionada ao poço n.º 3 do cartucho ou foi adicionado um volume incorreto da Solução de RNase A. Reprocessa a amostra com a Solução de RNase A ou trate a amostra de gDNA com RNase A.
Transporte de resina	<p>As amostras não foram misturadas apropriadamente ou durante os passos corretos durante o processamento. A não mistura adequada dos reagentes e amostras em conjunto no tubo de incubação ou poço n.º 1 pode afetar o transporte de resina no cartucho e tubo de eluição.</p> <p>Foi processada demasiada amostra ou amostra contendo uma quantidade excessiva de DNA genómico. Uma amostra excessiva pode causar o transporte de resina excessivo no cartucho e tubo de eluição.</p> <p>Algum transporte de resina é normal e não afeta o desempenho a jusante. Se necessário, use um Elution Magnet ([Cat.# AS4017, Cat.# AS4018 ou ambos]; disponível em separado) para transferir a eluição para um novo tubo. Consulte a Secção 11, Produtos Relacionados.</p>

## 11. Produtos Relacionados

### Instrumentos e acessórios

<b>Produto</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Cat.#</b>
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 de cada	AS8000
Maxwell® CSC Instrument*	1 de cada	AS6000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 de cada	SP6019
Tabuleiro da plataforma anterior do Maxwell® RSC/CSC 48	1 de cada	AS8401
Tabuleiro da plataforma posterior do Maxwell® RSC/CSC 48	1 de cada	AS8402
RSC/CSC Plungers	50/pacote	AS1331
Tubos de eluição (0,5 ml)	50/pacote	AS6201
Elution Magnet, 16 Posições	1 de cada	AS4017
Elution Magnet, 24 Posições	1 de cada	AS4018
Colunas de compensação	50 cada	Z3871
Solução de RNase A	1 ml	A7973
	5 ml	A7974
Solução de proteinase K (PK)	4 ml	MC5005
Nuclease-Free Water	25 ml	MC1191

\*Para utilização em diagnóstico in vitro. Este produto está disponível apenas em alguns países.

### Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite [www.promega.com](http://www.promega.com) para obter uma lista dos Maxwell® CSC Purification Kits disponíveis.

<sup>(a)</sup>Pat. dos EUA N.º 7,329,488 e S. Korean Pat. N.º 100483684.

© 2022 Promega Corporation. Todos os direitos reservados.

Maxwell é uma marca comercial registrada da Promega Corporation.

Os produtos podem estar cobertos por patentes pendentes ou por patentes emitidas ou podem ter algumas limitações. Visite o nosso Web site para obter mais informações.

Todos os preços e especificações estão sujeitos a alterações sem aviso prévio.

As características dos produtos estão sujeitas a alteração. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services, ou acesse ao catálogo da Promega online para obter as informações mais recentes acerca dos produtos da Promega.