

MANUAL TÉCNICO

Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit

Instruções de utilização do produto
AS1560

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

Nota: o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit só é compatível com a versão 4.0.0 ou superior do software Maxwell® CSC ou com a versão 4.1.1 ou superior do software Maxwell® CSC 48.

Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit

Toda a literatura técnica está disponível na Internet em: 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

1. Descrição	2
2. Componentes do produto e condições de armazenamento	3
3. Finalidade prevista/utilização prevista do produto	5
4. Limitações de utilização do produto.....	5
5. Antes de começar	6
5.A. Preparação de amostras de tecido FFPE	6
6. Preparação do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge	8
6.A. Preparar o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge.....	8
6.B. Protocolo de extração de DNA	9
6.C. Protocolo de extração de RNA	10
6.D. Protocolo de extração do ácido nucleico total	11
6.E. Protocolo de extração de DNA e RNA sequencial.....	12
7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument	15
8. Eficiências do fluxo de trabalho.....	19
9. Instruções pós-extração	20
10. Avaliação do desempenho analítico	20
10.A. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do DNA.....	20
10.B. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do RNA.....	22
10.C. Quantificação baseada em corantes fluorescentes	24
10.D. Reprodutibilidade	25
10.E. Inibição da amplificação por causa de substâncias interferentes	26
10.F. Contaminação cruzada.....	28
11. Avaliação do desempenho clínico.....	29
11.A. Fluxo de trabalho de extração de DNA	29
11.B. Fluxo de trabalho de extração de RNA	29
11.C. Fluxo de trabalho de extração do ácido nucleico total.....	29
11.D. Fluxo de trabalho de extração de DNA/RNA sequencial.....	30

12. Resolução de problemas	31
13. Criar um ambiente livre de ribonucleases	33
14. Produtos relacionados	34

O Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit está disponível apenas em alguns países.

1. Descrição

O Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit é utilizado em conjunto com os Maxwell® Instruments especificados na Tabela 1, de modo a proporcionar um método fácil para a extração eficiente e automática de DNA, RNA ou ácido nucleico total (TNA), ou de DNA e RNA sequencialmente a partir de amostras de tecido fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE). Os Maxwell® CSC Instruments são concebidos para serem utilizados com cartuchos de reagentes pré-dispensados e reagentes adicionais fornecidos com o kit. Os métodos de extração pré-programados proporcionam uma utilização mais simples e conveniente dos Maxwell® CSC Instruments. Os Maxwell® CSC Instruments permitem processar de uma até ao máximo de amostras permitido de forma eficiente com extração automática de DNA, RNA e ácido nucleico total (TNA) em aproximadamente 30 minutos e extrações sequenciais de DNA e RNA em menos de 1 hora. O DNA, RNA ou ácido nucleico total extraído pode ser utilizado diretamente em ensaios com base na amplificação a jusante.

Tabela 1. Instrumentos suportados.

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

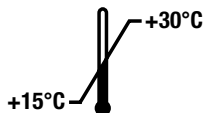
Princípio do método: o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit extrai ácido nucleico utilizando partículas paramagnéticas, que fornecem uma fase sólida móvel para otimizar a captura, a lavagem e a extração de amostras de DNA, RNA ou ácido nucleico total. Opcionalmente, tanto o DNA como o RNA podem ser extraídos sequencialmente da mesma amostra de tecido FFPE sem a necessidade de dividir o lisato. Os Maxwell® CSC Instruments são instrumentos de manuseamento de partículas magnéticas. Este sistema permite a ligação eficiente do ácido nucleico às partículas paramagnéticas no primeiro poço de um cartucho pré-cheio e move as partículas paramagnéticas ao longo dos poços do cartucho. Esta abordagem à captura magnética evita problemas comuns, como pontas entupidas ou transferências de reagentes parciais, que resultam no processamento subótimo da extração por outros sistemas automáticos normalmente utilizados.

Considerações sobre as amostras: a extração do ácido nucleico a partir de amostras de tecido FFPE pode ser desafiante devido às características do tecido, tais como fibrosidade, composição lipídica, teor de nuclease e o número de células disponíveis na secção do tecido. Além disso, a variabilidade na forma como o tecido é manuseado antes e durante a fixação, incluindo a duração da exposição ao formol durante o processo de fixação do tecido, influencia fortemente o grau de reticulação e a fragmentação do ácido nucleico no tecido FFPE. Esses atributos podem influenciar a qualidade e a quantidade de ácido nucleico amplificável que pode ser extraído a partir de secções de tecido FFPE. Durante o desenvolvimento, o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit foi avaliado com uma variedade de tipos de tecido FFPE humano para extrair o DNA, o RNA ou o ácido nucleico total amplificável disponível.

2. Componentes do produto e condições de armazenamento

PRODUTO	TAMANHO	CAT.#
Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit	48 preparações	AS1560

Para utilização em diagnóstico in vitro. Exclusivamente para utilização profissional. Quantidade suficiente para 48 isolamentos automáticos a partir de amostras de tecido FFPE. Os Maxwell® CSC Cartridges destinam-se a ser utilizados apenas com uma única amostra.



Inclui:

- 35 ml Óleo mineral
- 20 ml Tampão de lise
- 2 x 1 ml Proteinase K
- 2 x 100 µl Corante azul
- 2 x 1 ml MnCl₂, 0,09 M
- 3 frascos DNase I (liofilizada)
- 48 Maxwell® CSC Cartridges (CSCR)
- 50 CSC/RSC Plungers
- 2 x 50 Elution Tubes (0,5 ml)
- 25 ml Nuclease-Free Water

Condições de armazenamento: armazene o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit à temperatura ambiente (+15 a +30 °C). Armazene a DNase I reidratada entre -30 °C e -10 °C. **Não congele/descongele mais do que 10 vezes.**



Informações de segurança: os cartuchos contêm etanol e isopropanol. Estas substâncias devem ser consideradas inflamáveis, nocivas e irritantes.



Os componentes do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit foram concebidos para utilização com substâncias potencialmente infecciosas. Use equipamento de proteção individual adequado (por exemplo, luvas e óculos de proteção) durante o manuseamento de substâncias infecciosas. Cumpras as diretrizes institucionais quanto ao manuseamento e à eliminação de substâncias infecciosas utilizadas com este sistema.



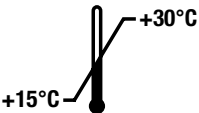













Atenção: manuseie os cartuchos com cuidado; as extremidades do selo podem ser cortantes.

2. Componentes do produto e condições de armazenamento (continuação)

Informação adicional: os componentes do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA 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. Não utilize os cartuchos se o selo do cartucho não estiver intacto no momento da receção.

Legenda de símbolos

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

3. Finalidade prevista/utilização prevista do produto

O Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit destina-se a ser utilizado, em conjunto com os Maxwell® CSC Instruments e os métodos Maxwell® CSC XtractAll, como um dispositivo médico para diagnóstico in vitro (IVD) para a realização do isolamento automatizado apenas do DNA, apenas do RNA, do DNA e do RNA sequencialmente ou do ácido nucleico total a partir de amostras de tecido humano fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE). O DNA, RNA ou ácido nucleico total extraído é adequado para utilização em ensaios de diagnóstico in vitro com base na amplificação.

O Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit destina-se a ser utilizado a uma temperatura entre 15 °C e 30 °C. A utilização fora deste intervalo de temperatura pode dar origem a resultados subótimos. As amostras de tecido FFPE preparadas com formol neutro tamponado a 10% podem ser utilizadas com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

O Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit destina-se exclusivamente a utilização profissional. Os resultados do diagnóstico obtidos através da utilização de DNA, RNA ou ácido nucleico total extraído com este sistema têm de ser interpretados em conjunto com outros dados clínicos ou laboratoriais.

4. Limitações de utilização do produto

O Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit destina-se apenas a ser utilizado com amostras de tecido FFPE. Não se destina a utilização com amostras de tecido não FFPE, como amostras de tecido frescas ou congeladas. As características de desempenho não foram estabelecidas utilizando amostras de tecido FFPE preparadas com fixadores diferentes do formol neutro tamponado a 10%.

A adequação do ácido nucleico extraído com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit para utilização na sequenciação de nova geração (NGS) foi demonstrada durante o desenvolvimento do produto, mas não foi validada.

O utilizador é responsável pelo estabelecimento das características de desempenho necessárias às aplicações de diagnóstico a jusante. É necessário incluir os controlos adequados em todas as aplicações de diagnóstico a jusante que utilizem DNA, RNA ou ácido nucleico total extraído com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

5. Antes de começar

Materiais que devem ser fornecidos pelo utilizador

- microcentrifugadora
- agitador vortex de bancada
- pipetadores e pontas de pipeta para o pré-processamento de amostras e transferência para cartuchos de reagentes pré-cheios
- tubos de 1,5–2,0 ml para a incubação de amostras (por exemplo, Microtubes, 1,5 ml; Cat.# V1231)
- blocos de aquecimento definidos para 56 °C e para 90 °C
- amostras de tecido FFPE (**nota:** as amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente [15–30 °C].)
- isopropanol, ≥99,5% grau para biologia molecular (para fluxos de trabalho de RNA, TNA e DNA/RNA sequencial)
- lâminas de barbear (**nota:** tenha cuidado ao utilizar lâminas de barbear para raspar a amostra de tecido FFPE da lâmina.)

Reconstitua um frasco liofilizado de DNase I com 275 µl de Nuclease-Free Water e 15 µl de corante azul, conforme necessário. Inverta o frasco para recuperar qualquer DNase I da parte inferior da tampa e agite suavemente para misturar; não agite por rotação. Armazene a DNase I reconstituída entre –30 °C e –10 °C. Não congele/descongele mais do que 10 vezes.

5.A. Preparação de amostras de tecido FFPE

Mantenha o ambiente livre de RNases durante o processamento. Utilize sempre pontas de pipeta livres de RNases e resistentes a aerossóis. Troque de luvas frequentemente de forma a reduzir a possibilidade de contaminação por RNase. Consulte a Secção 13, Criação de um ambiente livre de ribonucleases, para obter informações detalhadas.

Durante o desenvolvimento, foi obtido um desempenho ótimo do kit com secções de tecido FFPE até 20 µm de espessura total. Podem ser combinadas várias secções num tubo de amostra para extração com uma espessura máxima das secções combinadas ≤80 µm. As secções com uma espessura superior a 20 µm interferem com a digestão por proteinase K e resultam em colheitas baixas (consulte a secção 12). O utilizador deve otimizar o número de secções e a espessura da secção com base nos requisitos da análise a jusante.

Durante o desenvolvimento, foram avaliadas amostras de tecido FFPE da mama, do fígado e uterino como exemplares e verificou-se que apresentavam um desempenho aceitável. Uma grande variedade de tipos de tecido FFPE pode ser compatível com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit, mas deve ser avaliada pelo laboratório quanto ao desempenho de extração e compatibilidade com ensaios a jusante.

Pré-processamento de secções de tecido FFPE

1. Coloque a(s) secção(ões) de tecido FFPE num tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml. Se estiver a utilizar secções de tecido FFPE montadas em lâminas, raspe a(s) secção(ões) da(s) lâmina(s) utilizando uma lâmina de barbear limpa.

Nota: utilize uma nova lâmina de barbear limpa para diferentes amostras de tecido FFPE para evitar a contaminação cruzada das amostras.

2. Adicione 500 µl de óleo mineral aos tubos de amostra. Agite por rotação durante 10 segundos.
3. Aqueça as amostras a 90 °C durante 5 minutos. Aguarde até que as amostras fiquem à temperatura ambiente enquanto prepara a Master Mix conforme descrito no Passo 4.
4. Imediatamente antes de utilizar, prepare uma Master Mix de tampão de lise, de proteinase K e de corante azul, conforme apresentado abaixo:

Reagente	Quantidade/Reação	Reações	
		(Número de amostras + 2)	Total
Lysis Buffer	224 µl	n + 2	224 µl × (n + 2)
Proteinase K	25 µl	n + 2	25 µl × (n + 2)
Corante azul	1 µl	n + 2	2 µl × (n + 1)

5. Adicione 250 µl de Master Mix a cada tubo de amostra e agite por rotação durante 5 segundos.
Nota: não armazene a Master Mix restante não utilizada.
6. Centrifugue os tubos de amostra a 10.000 × g durante 20 segundos para separar as camadas. Se existir precipitado na camada aquosa (camada inferior azul), misture suavemente com uma ponta de pipeta para dispersar o precipitado. Deixe as camadas de óleo mineral e aquosa no tubo.
7. Transfira os tubos de amostra para um bloco de aquecimento a 56 °C e incube durante 15 minutos.
8. Transfira os tubos de amostra para um bloco de aquecimento a 90 °C e incube durante 1 hora.
9. Prossiga para a Secção 6 para a preparação do cartucho.

6. Preparação do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge

6.A. Preparar o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Cartridge

1. Troque de luvas antes de manusear os Maxwell® CSC Cartridges (CSCR), os CSC/RSC Plungers e os Elution Tubes. Os cartuchos estão instalados no(s) tabuleiro(s) da plataforma fora do Maxwell® Instrument e o(s) tabuleiro(s) da plataforma que contém os cartuchos e as amostras são transferidos para o instrumento para extração. Coloque cada um dos cartuchos no tabuleiro da plataforma com o poço n.º 1 (o poço maior do cartucho) o mais afastado possível dos Elution Tubes (Figura 1). 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 para remover a totalidade do selo da parte superior do cartucho. Certifique-se de que remove a totalidade da película aderente vedante do cartucho.



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

2. Coloque um êmbolo no poço n.º 8 de cada cartucho.
3. Coloque um Elution Tube vazio na posição do Elution Tube de cada cartucho no(s) tabuleiro(s) da plataforma.

Nota: utilize apenas os tubos de eluição fornecidos no Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Outros tubos de eluição podem não ser compatíveis com os Maxwell® CSC Instruments e podem afetar o desempenho da extração.

4. Adicione 50 µl de Nuclease-Free Water ao fundo de cada Elution Tube. Mantenha os tubos de eluição abertos durante a extração (Figura 1).

Nota: utilize apenas a Nuclease-Free Water fornecida no Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. A utilização de outros tampões de eluição pode afetar o desempenho da extração ou a utilização a jusante.

5. Prossiga para a secção apropriada listada abaixo para obter instruções específicas para cada fluxo de trabalho de extração.

Tipo de extração	Secção
DNA	6.B
RNA	6.C
Ácido nucleico total (TNA)	6.D
DNA/RNA sequencial	6.E

Notas de preparação do tabuleiro da plataforma



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.



Figura 1. Instalação e configuração do tabuleiro da plataforma. A Nuclease-Free Water é adicionada aos Elution Tubes, conforme indicado. Abra os Elution Tubes antes de iniciar um método de extração.

6.B. Protocolo de extração de DNA

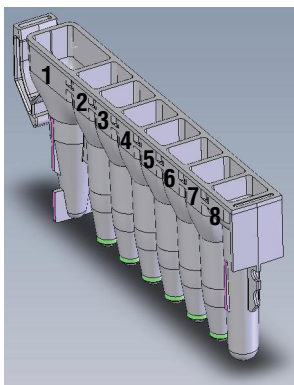
1. Após o término da incubação de 1 hora (Secção 5.A), transfira a fase aquosa azul para o poço n.º 1 do Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilize uma nova ponta de pipeta para cada amostra para evitar a contaminação cruzada.

Notas:

- a. Se algum material não digerido permanecer no final da incubação, centrifugue os tubos de amostra a $10.000 \times g$ durante 20 segundos para precipitar qualquer material não digerido. Não transfira qualquer material precipitado ou não digerido para o cartucho.
 - b. Transfira todo o volume da fase aquosa azul para o cartucho, evitando qualquer material não digerido, e extraia dentro de 30 minutos após a conclusão da incubação.
 - c. O volume da fase aquosa azul no tubo irá variar de acordo com a amostra de tecido FFPE introduzida e a composição.
2. Leia o código de barras na caixa do kit e selecione o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA. Toque em **Proseguir** para continuar.
 3. Coloque o tabuleiro da plataforma no Maxwell® Instrument, introduza as informações de acompanhamento do cartucho e da amostra no ecrã "Configuração do cartucho", confirme que os itens da lista de verificação da extração foram executados e toque no botão **Iniciar** para iniciar a execução da extração.

Nota: para obter instruções detalhadas sobre a configuração do instrumento, consulte a Secção 7.

6.B. Protocolo de extração de DNA (continuação)



Adições do utilizador aos poços:

1. Amostras pré-processadas
8. CSC/RSC Plunger

Figura 2. Maxwell® CSC Cartridge. A amostra de tecido FFPE pré-processada é adicionada ao poço n.º 1 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.

6.C. Protocolo de extração de RNA

1. Após o término da incubação de 1 hora (Secção 5.A), transfira a fase aquosa azul para o poço n.º 1 do Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilize uma nova ponta de pipeta para cada amostra para evitar a contaminação cruzada.

Notas:

- a. Se algum material não digerido permanecer no final da incubação, centrifugue os tubos de amostra a $10.000 \times g$ durante 20 segundos para precipitar qualquer material não digerido. Não transfira qualquer material precipitado ou não digerido para o cartucho.
 - b. Transfira todo o volume da fase aquosa azul para o cartucho, evitando qualquer material não digerido, e extraia dentro de 30 minutos após a conclusão da incubação.
 - c. O volume da fase aquosa azul no tubo irá variar de acordo com a amostra de tecido FFPE introduzida e a composição.
2. Imediatamente antes da utilização, prepare um cocktail de $MnCl_2$ e DNase I conforme indicado abaixo:

Reagente	Quantidade/Reação	Reações	
		(Número de amostras [n] + 2)	Total
$MnCl_2$, 0,09 M	17 μ l	n + 2	17 μ l \times (n + 2)
DNase I (com corante azul) ¹	10 μ l	n + 2	10 μ l \times (n + 2)

¹Armazene a DNase I reconstituída restante com corante azul a uma temperatura entre $-30\text{ }^\circ\text{C}$ e $-10\text{ }^\circ\text{C}$.

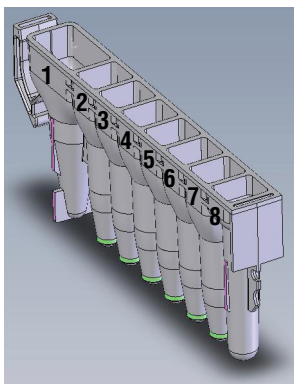
3. Adicione 27 μ l de cocktail de DNase I ao poço n.º 7 de cada cartucho.

Nota: não armazene o cocktail de DNase I restante não utilizado.

4. Adicione 500 μ l de isopropanol a 100% ao poço n.º 1.

5. Leia o código de barras na caixa do kit e selecione o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA. Toque em **Prosseguir** para continuar.
6. Coloque o tabuleiro da plataforma no Maxwell® Instrument, introduza as informações de acompanhamento do cartucho e da amostra no ecrã "Configuração do cartucho", confirme que os itens da lista de verificação da extração foram executados e toque no botão **Iniciar** para iniciar a execução da extração.

Nota: para obter instruções detalhadas sobre a configuração do instrumento, consulte a Secção 7.



Adições do utilizador aos poços:

1. Amostras pré-processadas e 500 µl de isopropanol a 100%
7. 27 µl de cocktail de DNase I
8. CSC/RSC Plunger

Figura 3. Maxwell® CSC Cartridge. A amostra de tecido FFPE pré-processada e o isopropanol são adicionados ao poço n.º 1, o cocktail de DNase I ao poço n.º 7 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.

6.D. Protocolo de extração do ácido nucleico total

1. Após o término da incubação de 1 hora (Secção 5.A), transfira a fase aquosa azul para o poço n.º 1 do Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilize uma nova ponta de pipeta para cada amostra para evitar a contaminação cruzada.

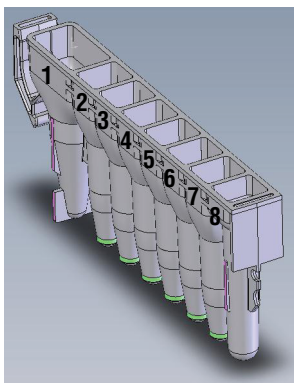
Notas:

- a. Se algum material não digerido permanecer no final da incubação, centrifugue os tubos de amostra a 10.000 × g durante 20 segundos para precipitar qualquer material não digerido. Não transfira qualquer material precipitado ou não digerido para o cartucho.
 - b. Transfira todo o volume da fase aquosa azul para o cartucho, evitando qualquer material não digerido, e extraia dentro de 30 minutos após a conclusão da incubação.
 - c. O volume da fase aquosa azul no tubo irá variar de acordo com a amostra de tecido FFPE introduzida e a composição.
2. Adicione 500 µl de isopropanol a 100% ao poço n.º 1.
 3. Leia o código de barras na caixa do kit e selecione o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid. Toque em **Prosseguir** para continuar.

6.D. Protocolo de extração do ácido nucleico total (continuação)

4. Coloque o tabuleiro da plataforma no Maxwell® Instrument, introduza as informações de acompanhamento do cartucho e da amostra no ecrã "Configuração do cartucho", confirme que os itens da lista de verificação da extração foram executados e toque no botão **Iniciar** para iniciar a execução da extração.

Nota: para obter instruções detalhadas sobre a configuração do instrumento, consulte a Secção 7.



Adições do utilizador aos poços:

1. Amostras pré-processadas e 500 µl de isopropanol a 100%
8. CSC/RSC Plunger

Figura 4. Maxwell® CSC Cartridge. A amostra de tecido FFPE pré-processada e o isopropanol são adicionados ao poço n.º 1 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.

6.E. Protocolo de extração de DNA e RNA sequencial

Ao seleccionar o método de extração de DNA/RNA sequencial, o software Maxwell® procederá a duas execuções de extração distintas em sucessão, com o utilizador a adicionar alguns reagentes aos cartuchos entre estas execuções. Para o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequencial, o primeiro método extrai o DNA da amostra de tecido FFPE lisado para o primeiro tubo de eluição, enquanto o segundo método extrai o RNA da mesma amostra para um segundo tubo de eluição utilizando o mesmo cartucho e êmbolo. Abaixo estão as instruções para preparar os cartuchos para cada uma dessas execuções de extração.

Execução 1: extração de DNA

1. Após o término da incubação de 1 hora (Secção 5.A), transfira a fase aquosa azul para o poço n.º 1 do Maxwell® CSC Cartridge (CSCR). Utilize uma nova ponta de pipeta para cada amostra para evitar a contaminação cruzada.

Notas:

- a. Se algum material não digerido permanecer no final da incubação, centrifugue os tubos de amostra a 10.000 × g durante 20 segundos para precipitar qualquer material não digerido. Não transfira qualquer material precipitado ou não digerido para o cartucho.
- b. Transfira todo o volume da fase aquosa azul para o cartucho, evitando qualquer material não digerido, e extraia dentro de 30 minutos após a conclusão da incubação.
- c. O volume da fase aquosa azul no tubo irá variar de acordo com a amostra de tecido FFPE introduzida e a composição.

2. Leia o código de barras na caixa do kit e, em seguida, selecione o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential e toque em **Prosseguir** para continuar.
3. Coloque o tabuleiro da plataforma no Maxwell® Instrument, introduza as informações de acompanhamento do cartucho e da amostra no ecrã "Configuração do cartucho", confirme que os itens da lista de verificação da extração foram executados e toque no botão **Iniciar** para iniciar a execução da extração.

Nota: para obter instruções detalhadas sobre a configuração do instrumento, consulte a Secção 7.

Adições do utilizador aos poços:

1. Amostras pré-processadas
8. CSC/RSC Plunger

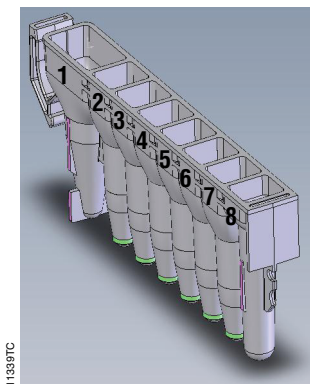


Figura 5. Maxwell® CSC Cartridge. A amostra de tecido FFPE pré-processada é adicionada ao poço n.º 1 e um êmbolo é adicionado ao poço n.º 8.

Instruções entre execuções

Entre a primeira extração de DNA de FFPE e a segunda extração de RNA de FFPE para o método de DNA/RNA sequencial, execute os seguintes passos:

4. Siga as instruções no ecrã no final do método de extração de DNA sequencial de FFPE para abrir a porta. Verifique se os êmbolos se encontram no poço n.º 8 dos cartuchos, no final da execução. Se os êmbolos não forem removidos da barra de êmbolo, siga as instruções do Manual de funcionamento adequadas para o seu Maxwell® Instrument (consulte a Tabela 1) para realizar um processo de Limpeza para descarregar os êmbolos. Para preparar a execução da extração de RNA sequencial de FFPE, é apresentado um novo ecrã de configuração do cartucho.
5. Tape e remova os Elution Tubes que contêm DNA imediatamente após a execução para evitar a evaporação do eluato.

6.E. Protocolo de extração de DNA e RNA sequencial (continuação)

6. No final do processamento da extração de DNA sequencial de FFPE, a resina é depositada no poço n.º 2 para preparar o processamento da extração de RNA sequencial de FFPE.

Notas:

- Não retire nem deite fora os cartuchos ou os êmbolos do tabuleiro da plataforma. Serão reutilizados para a extração de RNA sequencial de FFPE.
 - Proceda à extração de RNA sequencial de FFPE nas 2 horas seguintes à conclusão da extração de DNA sequencial de FFPE.
7. É apresentado um ecrã de configuração do cartucho, indicando as posições das amostras e as informações de acompanhamento introduzidas antes da primeira execução de extração de DNA. Se necessário, estas informações podem ser editadas para refletir quaisquer alterações nos cartuchos que estão a ser processados, tocando no botão **Ativar edição**. Para obter mais informações, consulte a Secção 8.
8. Toque no botão **Prosseguir** para abrir o ecrã "Lista de verificação da extração".

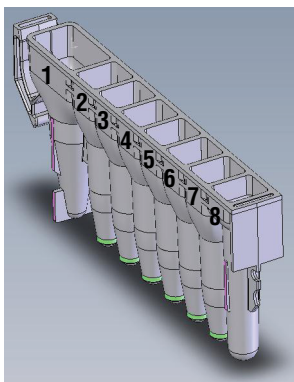
Execução 2: extração de RNA

9. Coloque um Elution Tube vazio na posição do Elution Tube de cada cartucho no(s) tabuleiro(s) da plataforma.
- Nota:** utilize apenas os Elution Tubes fornecidos no Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. Outros tubos de eluição podem não ser compatíveis com o Maxwell® CSC Instrument e podem afetar o desempenho da extração de RNA.
10. Adicione 50 µl de Nuclease-Free Water ao fundo de cada Elution Tube. Os Elution Tubes têm de permanecer abertos durante a extração de RNA (Figura 7).
- Nota:** utilize apenas a Nuclease-Free Water fornecida no Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit. A utilização de outros tampões de eluição pode afetar o desempenho da extração de RNA ou a utilização a jusante.
11. Imediatamente antes da utilização, prepare um cocktail de MnCl₂ e DNase I conforme indicado abaixo:

Reagente	Quantidade/Reação	Reações	
		(Número de amostras + 2)	Total
MnCl ₂ , 0,09 M	17 µl	n + 2	17 µl × (n + 2)
DNase I ¹ (com corante azul)	10 µl	n + 2	10 µl × (n + 2)

¹Armazene a DNase I reconstituída restante com corante azul a uma temperatura entre -30 °C e -10 °C.

12. Adicione 27 µl de cocktail de DNase I ao poço n.º 7 de cada cartucho.
- Nota:** não armazene qualquer cocktail de DNase I restante não utilizado.
13. Adicione 500 µl de isopropanol a 100% ao poço n.º 1.
14. Coloque o tabuleiro da plataforma no Maxwell® instrument, confirme que os itens da lista de verificação da extração foram executados e toque no botão **Iniciar** para iniciar o segundo processamento da extração de RNA sequencial de FFPE.
- Nota:** para obter instruções detalhadas sobre a configuração do instrumento, consulte a Secção 7.



11599TC

Adições do utilizador aos poços:

1. 500 µl de isopropanol a 100% (adicione à amostra existente no poço n.º 1)
7. 27 µl de cocktail de DNase I
8. CSC/RSC Plunger (o mesmo êmbolo utilizado durante a extração de DNA sequencial de FFPE que já deve estar presente no poço n.º 8)

Figura 6. Maxwell® CSC Cartridge. Adicione isopropanol à amostra existente no poço n.º 1, o cocktail de DNase I ao poço n.º 7 e o mesmo êmbolo utilizado na extração de DNA sequencial de FFPE deve estar presente no poço n.º 8.



1000716

Figura 7. Instalação e configuração do tabuleiro da plataforma. A Nuclease-Free Water é adicionada aos Elution Tubes, conforme indicado. Abra os Elution Tubes antes de iniciar o método de extração.

7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument

Os Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA e DNA/RNA Sequential Methods para o Maxwell® CSC Instrument podem ser transferidos em:

www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-cscsoftware-firmware-methods/

Os Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, RNA, TNA e DNA/RNA Sequential Methods para o Maxwell® CSC 48 Instrument podem ser transferidos em:

www.promega.com/resources/software-firmware/maxwell-maxprep/maxwell-csc-48-methods/

Nota: o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit só é compatível com a versão 4.0.0 ou superior do software Maxwell® CSC ou com a versão 4.1.1 ou superior do software Maxwell® CSC 48.

7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument (continuação)

Se suspeitar que o instrumento pode estar contaminado com RNase, limpe-o antes de o utilizar. Siga as instruções na secção Limpeza e manutenção do *Manual de funcionamento do Maxwell® CSC Instrument IVD Mode #TM457* ou o *Manual de funcionamento do Maxwell® CSC 48 Instrument IVD Mode #TM623*.

1. Ligue o Maxwell® Instrument e o Tablet PC. Inicie a sessão no Tablet PC e inicie o software Maxwell® CSC IVD-mode tocando duas vezes no ícone no ambiente de trabalho. O instrumento executa uma autoverificação e coloca todas as peças móveis na respetiva posição inicial.
2. Selecione **Iniciar** no ecrã Página Inicial.
3. Leia ou introduza o código de barras no canto superior direito da etiqueta do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit (Figura 8).

Nota: o código de barras do método Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit é necessário para a extração nos Maxwell® CSC Instruments. A etiqueta do kit contém dois códigos de barras. O código de barras do método é indicado na Figura 8. Contacte o nosso centro de assistência, Promega Technical Services (techserv@promega.com), caso o código de barras não possa ser lido.

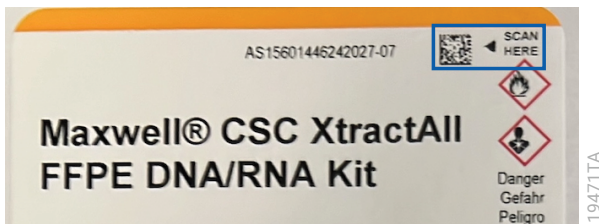
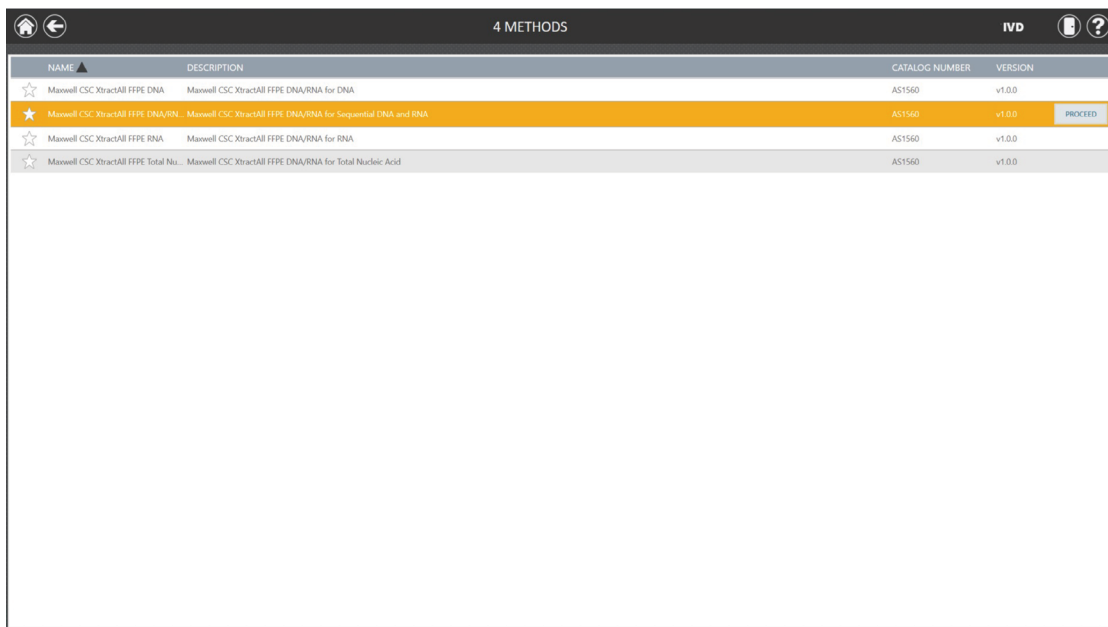


Figura 8. Etiqueta do kit que indica o código de barras a ler. O código de barras a ler para iniciar um método de extração é apresentado na caixa azul, na parte superior direita da etiqueta do kit.

- No ecrã de seleção do método, selecione o método que corresponde ao fluxo de trabalho que está a ser processado: Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, Maxwell® CSC XtractAll FFPE Total Nucleic Acid ou Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential.



19155TA

Figura 9. Ecrã de seleção do método. Selecione o método que corresponde ao fluxo de trabalho pretendido.

- Verifique se o método de extração correto foi selecionado e toque no botão **Prosseguir**.
- No ecrã de "Configuração do cartucho", toque nas posições do cartucho para selecionar ou anular a seleção de qualquer posição a utilizar na execução da extração. Introduza qualquer informação de acompanhamento de amostra e toque no botão **Prosseguir** para continuar.

Nota: quando estiver a usar o Maxwell® CSC 48 Instrument, toque no botão **Anterior** ou **Posterior** para marcar ou desmarcar as posições dos cartuchos em cada tabuleiro da plataforma.

7. Configuração e execução do Maxwell® Instrument (continuação)

7. Após abrir a porta do instrumento, confirme que todos os itens da lista de verificação da extração foram realizados. Verifique se as amostras pré-processadas foram adicionadas ao poço n.º 1 dos cartuchos, se o isopropanol foi adicionado ao poço n.º 1 do cartucho (apenas para fluxos de trabalho de RNA, TNA e RNA sequencial de FFPE), se o cocktail de DNase I foi adicionado ao poço n.º 7 do cartucho (apenas para fluxos de trabalho de RNA e RNA sequencial de FFPE), se os cartuchos estão carregados no instrumento, se os tubos de eluição destapados estão presentes com Nuclease-Free Water e se os êmbolos estão no poço n.º 8. Transfira o tabuleiro da plataforma que contém os cartuchos preparados para a plataforma do Maxwell® Instrument.

Inserir o tabuleiro 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 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 nos tabuleiros da plataforma Maxwell® CSC 48 de 24 posições para determinar se devem ser colocadas na frente ou atrás do instrumento.

8. Confirme se todos os pré-processamentos indicados foram realizados e toque em **Iniciar** para fechar a porta do instrumento e iniciar o processamento.

Nota: ao utilizar o Maxwell® CSC 48 Instrument, se o Vision System tiver sido ativado, os tabuleiros da plataforma serão digitalizados à medida que a porta 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 leitura do tabuleiro da plataforma e iniciar a extração.



Aviso: perigo de entalamento.

9. O Maxwell® Instrument irá iniciar imediatamente a execução de extração. O ecrã irá apresentar os passos 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 abortada antes da conclusão, poderá ser-lhe pedido para verificar se os êmbolos ainda estão carregados na barra do êmbolo. Se existirem êmbolos na barra do êmbolo, deve realizar a Limpeza quando pedido, seguindo as instruções do Manual de funcionamento do Maxwell® Instrument (consulte a Tabela 1). Se os êmbolos não estão presentes na barra do êmbolo, pode escolher saltar a Limpeza quando pedido. As amostras serão perdidas.

10. Quando a execução de extração (fluxos de trabalho de DNA, RNA, TNA) ou ambas as execuções de extração de DNA/RNA sequencial estiverem concluídas, a interface do utilizador apresentará uma mensagem a indicar que o método terminou.

Fim da execução

11. 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 de funcionamento do Maxwell® Instrument (consulte a Tabela 1) para desempenhar um processo de Limpeza para tentar descarregar os êmbolos.
12. Tape e remova os Elution Tubes que contêm o seu ácido nucleico imediatamente após a execução para evitar a evaporação dos eluatos. Remova o(s) tabuleiro(s) da plataforma Maxwell® do instrumento.

Nota: para remover o 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 desinfecção UV, para evitar danificar o ácido nucleico extraído. As amostras de DNA podem ser armazenadas até uma semana a 4 °C e até um mês a -20 °C. As amostras de RNA e TNA podem ser armazenadas durante a noite entre -30 °C e -10 °C, ou a menos de -60 °C para armazenamento a longo prazo.



13. Remova os cartuchos e os êmbolos do(s) tabuleiro(s) da plataforma Maxwell® e elimine-os como resíduos perigosos de acordo com os procedimentos da sua instituição. Os cartuchos e os êmbolos destinam-se a ser utilizados com uma única amostra de tecido FFPE num único fluxo de trabalho, e os tubos de eluição destinam-se a uma única utilização. Não reutilize os Maxwell® CSC Cartridges, os CSC/RSC Plungers ou os Elution Tubes com mais de uma amostra.

8. Eficiências do fluxo de trabalho

O fluxo de trabalho DNA/RNA sequencial do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit combina o método de extração apenas de DNA e o método de extração apenas de RNA num único protocolo. Por conseguinte, ao utilizar o fluxo de trabalho DNA/RNA Sequencial, a extração do DNA é realizada primeiro, seguida da extração do RNA a partir da mesma amostra de tecido FFPE. O fluxo de trabalho DNA/RNA sequencial foi concebido exclusivamente para extrair DNA e RNA em tubos de eluição separados, conservando simultaneamente as informações de acompanhamento da amostra. No entanto, o acompanhamento da amostra é suficientemente flexível para aceitar modificações entre as duas execuções.

Fluxos de trabalho disponíveis no método de DNA/RNA sequencial

Passo	DNA/RNA sequencial	Apenas DNA	Apenas RNA
Adicione as amostras, os cartuchos e as informações de acompanhamento das amostras	Adicionar	Adicionar	
Primeira extração (DNA) do método sequencial	X	X	
Remova os eluatos de DNA do instrumento	X	X	
Altere as amostras, os cartuchos e as informações de acompanhamento das amostras	X	Remover	Adicionar
Segunda extração (RNA) do método sequencial	X		X
Remova os eluatos de RNA do instrumento	X		X

9. Instruções pós-extração

Determine se a colheita e a pureza do ácido nucleico extraído correspondem aos requisitos de introdução do ensaio de diagnóstico a jusante antes da utilização nesse ensaio. O desempenho do kit foi avaliado com base na amplificação e na quantificação baseada em corantes fluorescentes dos ácidos nucleicos extraídos. Outros métodos de quantificação, incluindo a absorvância, podem não estar correlacionados com a amplificação do ácido nucleico ou com a quantificação baseada na fluorescência. As leituras de absorvância dos ácidos nucleicos extraídos de amostras de tecido FFPE podem sobreavaliar a colheita; recomendamos que utilize métodos mais específicos para determinar a colheita de ácidos nucleicos.

10. Avaliação do desempenho analítico

O desempenho analítico do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit foi avaliado utilizando amostras de tecido FFPE humano processadas nos Maxwell® CSC e Maxwell® CSC 48 Instruments. O desempenho da extração de DNA foi avaliado utilizando o fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential, uma vez que o fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA é idêntico à parte inicial da extração de DNA do fluxo de trabalho de extração Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential.

10.A. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do DNA

Tabela 2. Amplificação do DNA extraído utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential e TNA. O DNA e o ácido nucleico total foram extraídos separadamente de seis replicados de amostras individuais de secções únicas de tamanho típico de tecidos FFPE da mama, do fígado e uterino, utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential e TNA, respetivamente. O DNA extraído e o ácido nucleico total foram utilizados num ensaio de qPCR para amplificação de RNase P H1 (102 pb) para avaliar a quantidade de DNA, bem como o gene de transcriptase reversa da telomerase (TERT) (164 pb) como um alvo de DNA mais longo para avaliar a qualidade do DNA. É apresentada a concentração de DNA média para cada conjunto de replicados. A colheita média de DNA de todas as amostras de tecido FFPE foi de, pelo menos, 100 cópias/μl de RNase P H1 e de, pelo menos, 25 cópias/μl de TERT.

Fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll	Tipo de tecido FFPE	Concentração média de DNA (cópias/μl)	
		RNase P H1	TERT
DNA/RNA Sequential	Mama	5333	7162
	Fígado	10363	19609
	Uterino	2762	936
TNA	Mama	1234	3815
	Fígado	3718	11894
	Uterino	1173	894

Tabela 3. Escalabilidade da colheita de DNA utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential e TNA. O DNA e o ácido nucleico total foram extraídos separadamente de seis replicados de amostras individuais de uma e duas secções de tamanho típico de tecidos FFPE da mama, do fígado e uterino, utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential e TNA, respetivamente. O DNA extraído e o ácido nucleico total foram utilizados num ensaio de qPCR para amplificação de RNase P H1 (102 pb) para avaliar a quantidade de DNA, bem como TERT (164 pb) como um alvo do gene mais longo para avaliar a qualidade do DNA. É apresentado o rácio médio da concentração de DNA entre uma e duas secções de tecido FFPE para cada conjunto de replicados. O rácio médio da concentração de DNA extraído de duas secções em relação a uma secção de amostras de tecido FFPE foi de, pelo menos, 1,4 para a RNase P H1 e o TERT.

Fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll	Tipo de tecido FFPE	Rácio médio de concentração de DNA de duas versus uma única secção de tecido FFPE	
		RNase P H1	TERT
DNA/RNA Sequential	Mama	2,1	2,2
	Fígado	1,7	1,7
	Uterino	2,1	2,3
TNA	Mama	1,9	2,0
	Fígado	2,1	2,2
	Uterino	1,9	1,9

10.B. Quantidade, qualidade e capacidade de amplificação do RNA

Tabela 4. Amplificação do RNA extraído utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential e TNA. O RNA e o ácido nucleico total foram extraídos de seis replicados individuais de secções únicas de tamanho típico de tecidos FFPE da mama, do fígado e uterinos. A extração de RNA utilizou os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequential; a extração de ácido nucleico total utilizou o fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. O RNA extraído e o ácido nucleico total foram utilizados num ensaio de RT-qPCR para amplificação do RNA da hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1) (100 pb) para avaliar a quantidade de RNA, bem como do RNA da β -actina (ACTB) (171 pb) como alvo de RNA mais longo para avaliar a qualidade do RNA. É apresentada a concentração média de RNA para cada conjunto de replicados. A colheita média de RNA de todas as amostras de tecido FFPE foi de, pelo menos, 0,032 ng/ μ l para os alvos de RNA HPRT1 e ACTB.

Fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll	Tipo de tecido FFPE	Concentração média de RNA (ng/ μ l)	
		HPRT1	ACTB
RNA	Mama	0,27	0,17
	Fígado	0,71	0,30
	Uterino	0,91	0,30
DNA/RNA Sequential	Mama	0,52	0,21
	Fígado	0,76	0,21
	Uterino	0,64	0,13
TNA	Mama	0,91	0,21
	Fígado	1,11	0,09
	Uterino	1,45	0,28

Tabela 5. Escalabilidade da colheita de RNA utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequential e TNA. O RNA e o ácido nucleico total foram extraídos de seis replicados individuais de uma ou duas secções de tamanho típico de tecidos FFPE da mama, do fígado e uterinos. O RNA foi extraído utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequential; o ácido nucleico total foi extraído utilizando o fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. O RNA extraído e o ácido nucleico total foram utilizados num ensaio de RT-qPCR para amplificação do RNA HPRT1 (100 pb) para avaliar a quantidade de RNA, bem como o RNA ACTB (171 pb) como alvo de RNA mais longo para avaliar a qualidade do RNA. É apresentado o rácio médio da concentração de RNA entre uma e duas secções para cada conjunto de replicados. O rácio médio da concentração de RNA extraído de duas secções versus uma única secção de amostras de tecido FFPE foi de, pelo menos, 1,4 para os alvos de HPRT1 e ACTB.

**Rácio médio da concentração de RNA de
duas versus uma única secção de tecido FFPE**

Fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE	Tipo de tecido FFPE	HPRT1	ACTB
RNA	Mama	1,6	1,4
	Fígado	1,7	1,5
	Uterino	1,8	1,6
DNA/RNA Sequential	Mama	1,8	1,6
	Fígado	1,7	1,5
	Uterino	2,1	2,0
TNA	Mama	1,4	1,6
	Fígado	2,6	2,2
	Uterino	1,9	1,7

10.C. Quantificação baseada em corantes fluorescentes

Tabela 6. Quantificação de DNA e RNA com base em corante fluorescente utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential e RNA. O DNA e o RNA foram extraídos de seis replicados individuais de secções únicas de tamanho típico de tecidos FFPE da mama, do fígado e uterinos. O DNA foi extraído utilizando o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential; o RNA foi extraído utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequential. A quantidade de DNA extraído foi avaliada com um corante fluorescente específico para DNA de cadeia dupla e a quantidade de RNA extraído foi avaliada com um corante fluorescente específico para RNA. As colheitas médias de DNA e RNA para cada conjunto de replicados foram calculadas utilizando os volumes de eluição recuperados e são mostradas abaixo. A colheita média de DNA e RNA extraídos de todas as amostras de tecido FFPE, quantificada por um método baseado em corante fluorescente, foi de, pelo menos, 100 ng.

Analito	Fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE	Tipo de tecido FFPE	Colheita (ng)
DNA	DNA/RNA Sequential	Mama	279
		Fígado	367
		Uterino	154
RNA	RNA	Mama	445
		Fígado	2.199
		Uterino	1.153
	DNA/RNA Sequential	Mama	616
		Fígado	1.330
		Uterino	736

10.D. Reprodutibilidade

Tabela 7. Reprodutibilidade da extração de ácidos nucleicos utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequencial e TNA. Para avaliar a reprodutibilidade da extração de ácidos nucleicos, um único utilizador realizou três execuções de extração individuais para cada um dos fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequencial e TNA utilizando amostras de tecido FFPE pré-processadas e agrupadas. Os eluatos foram utilizados num ensaio de qPCR para determinar a quantidade de DNA destinado à RNase P H1 (102 pb) ou num ensaio de RT-qPCR para determinar a quantidade de RNA destinado ao RNA HPRT1 (100 pb). O coeficiente de variação percentual interexecuções e intraexecuções foi calculado para extrações de DNA e RNA para diferentes fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE utilizando os volumes de eluição recuperados e é mostrado abaixo. Todos os coeficientes de variação percentual resultantes foram inferiores a 15%.

Analito	Fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE	Número de execução	Coefficiente de variação percentual intraexecução	Coefficiente de variação percentual interexecução
DNA	DNA/RNA Sequencial	1	13%	10%
		2	8%	
		3	7%	
	TNA	1	12%	11%
		2	9%	
		3	8%	
RNA	RNA	1	14%	12%
		2	9%	
		3	13%	
	DNA/RNA Sequencial	1	5%	6%
		2	6%	
		3	8%	
	TNA	1	14%	11%
		2	5%	
		3	12%	

10.E. Inibição da amplificação por causa de substâncias interferentes

Tabela 8. Avaliação da inibição da amplificação do DNA extraído utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequencial e TNA. O DNA ou o ácido nucleico total foi extraído de quatro replicados individuais de uma ou duas secções de tamanho típico de tecidos FFPE da mama, do fígado e uterinos. A extração de DNA utilizou o fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequencial; a extração de ácido nucleico total utilizou o fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Foram utilizados dois microlitros de cada um dos mesmos eluatos de DNA ou de ácidos nucleicos totais, sem diluição e diluídos quatro vezes, num ensaio de qPCR destinado à RNase P H1 (102 pb) para avaliar o efeito de quaisquer substâncias interferentes. Os valores de C_q de eluatos sem diluição e diluídos quatro vezes foram comparados para avaliar a inibição nos eluatos individuais com um valor de ΔC_q de 2 ± 1 ciclos, indicando sem inibição. Os valores de ΔC_q para todos os eluatos de amostras individuais variaram entre 1,9 e 2,5, indicando uma inibição indetetável na amplificação do DNA utilizando o DNA ou o ácido nucleico total extraído com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

Tipo de tecido FFPE	Número da amostra	Número de secções	Fluxo de trabalho TNA	Fluxo de trabalho DNA/RNA Sequencial
Mama	1	1	2,1	2,0
	2		2,0	2,1
	3		2,1	2,1
	4		2,1	2,2
	1	2	2,1	2,3
	2		2,2	2,2
	3		2,2	2,4
	4		2,1	2,3
Fígado	1	1	2,0	2,1
	2		2,0	2,0
	3		2,0	2,2
	4		2,2	2,3
	1	2	1,9	2,1
	2		2,1	2,0
	3		2,1	2,3
	4		2,2	2,2

Tipo de tecido FFPE	Número da amostra	Número de secções	Fluxo de trabalho TNA	Fluxo de trabalho DNA/RNA Sequencial
Uterino	1	1	2,3	2,5
	2		2,3	2,2
	3		2,2	2,3
	4		2,2	2,4
	1	2	2,1	2,2
	2		2,0	2,1
	3		2,0	2,0
	4		2,1	2,2

Tabela 9. Avaliação da inibição da amplificação do RNA extraído utilizando os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequencial e TNA. O RNA ou o ácido nucleico total foi extraído de quatro replicados individuais de uma ou duas secções de tamanho típico de tecidos FFPE da mama, do fígado e uterinos. A extração de RNA utilizou os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA ou DNA/RNA Sequencial; a extração de ácido nucleico total utilizou o fluxo de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. Foram utilizados dois microlitros de cada um dos mesmos eluatos de RNA ou de ácido nucleico total, sem diluição e diluídos quatro vezes, num ensaio de RT-qPCR destinado ao RNA HPRT1 (100 pb) para avaliar o efeito de quaisquer substâncias interferentes. Os valores de C_q dos eluatos sem diluição e dos eluatos diluídos quatro vezes foram comparados para avaliar a inibição em eluatos individuais com um ΔC_q de 2 ± 1 ciclos, indicando sem inibição. Os valores de ΔC_q para todos os eluatos de amostras individuais variaram entre 1,2 e 2,7, indicando uma inibição indetetável na amplificação do RNA utilizando o RNA ou o ácido nucleico total extraído com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit.

Tipo de tecido FFPE	Número da amostra	Número de secções	Fluxo de trabalho RNA	Fluxo de trabalho TNA	Fluxo de trabalho DNA/RNA Sequencial
Mama	1	1	2,7	1,7	2,4
	2		1,6	1,5	1,4
	3		2,0	1,4	1,5
	4		1,5	1,7	1,7
	1	2	1,4	1,5	1,6
	2		1,7	1,4	1,5
	3		1,8	2,3	2,1
	4		2,4	1,7	1,6

Tipo de tecido FFPE	Número da amostra	Número de seções	Fluxo de trabalho RNA	Fluxo de trabalho TNA	Fluxo de trabalho DNA/RNA Sequencial
Fígado	1	1	1,7	1,3	1,5
	2		1,6	2,2	1,6
	3		1,9	1,5	1,6
	4		1,9	1,5	2,1
	1	2	1,8	1,8	1,4
	2		1,3	1,5	1,9
	3		1,7	1,8	2,0
	4		1,9	2,1	1,2
Uterino	1	1	1,8	1,7	2,1
	2		1,7	2,3	1,4
	3		2,0	2,0	1,9
	4		1,8	2,1	1,6
	1	2	2,0	2,2	1,8
	2		1,7	1,4	1,2
	3		1,9	1,5	1,6
	4		1,7	1,8	2,1

10.F. Contaminação cruzada

A contaminação cruzada foi avaliada utilizando o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit com os Maxwell® CSC Instruments, alternando as posições dos Maxwell® CSC Cartridges que continham amostras de tecido FFPE humano e amostras de tecido FFPE de rato no tabuleiro de plataforma Maxwell® CSC/RSC numa única execução de extração. Foram testados os fluxos de trabalho Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA, DNA/RNA Sequencial e TNA. A presença de DNA ou RNA humano nas amostras de rato avaliadas por qPCR ou RT-qPCR, respetivamente, foi utilizada para identificar qualquer potencial contaminação cruzada dos Maxwell® CSC Cartridges próximos. Todas as amostras de tecido FFPE de rato que foram processadas em posições na plataforma adjacentes a amostras de tecido FFPE humano apresentaram valores de C_q superiores aos valores de C_q obtidos para as concentrações mais baixas de DNA ou RNA da respetiva curva padrão.

11. Avaliação do desempenho clínico

A avaliação do desempenho clínico do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit foi realizada por um laboratório clínico externo utilizando o Maxwell® CSC 48 Instrument. O DNA, o RNA e o ácido nucleico total (TNA) foram extraídos de amostras de tecido FFPE humano utilizando os diferentes métodos de extração Maxwell® CSC XtractAll FFPE e os ácidos nucleicos foram amplificados num ensaio clinicamente relevante.

11.A. Fluxo de trabalho de extração de DNA

O DNA foi extraído de amostras de tecido FFPE humano de doze doadores individuais por um único dispositivo de teste, utilizando o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA e o método de purificação de DNA padrão do laboratório clínico externo como referência. Os eluatos de DNA resultantes foram analisados por um ensaio de qPCR utilizando o cobas® EGFR Mutation Test. Os resultados dos testes baseados na amplificação foram concordantes entre todas as doze amostras de DNA extraídas com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit e o método de extração de DNA de referência do laboratório.

11.B. Fluxo de trabalho de extração de RNA

O RNA foi extraído de amostras de tecido FFPE humano de doze doadores individuais por um único dispositivo de teste, utilizando o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA e o método de purificação de RNA padrão do laboratório clínico externo como referência. Os eluatos de RNA resultantes foram analisados por um ensaio de RT-qPCR com iniciadores de hipoxantina fosforibosiltransferase 1 (HPRT1). Os resultados do ensaio de amplificação foram concordantes em todas as doze amostras de RNA extraídas com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit e o método de extração de RNA de referência do laboratório.

11.C. Fluxo de trabalho de extração do ácido nucleico total

O ácido nucleico total (TNA) foi extraído de amostras de tecido FFPE humano de doze doadores individuais por um único dispositivo de teste utilizando o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE TNA. As secções das mesmas doze amostras de tecido FFPE foram utilizadas pelo mesmo dispositivo de teste para extrair DNA e RNA separadamente, utilizando os métodos de referência do laboratório clínico externo para a extração de DNA e RNA, respetivamente.

Os eluatos de TNA resultantes do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit e os eluatos de DNA do método de extração de DNA de referência do laboratório foram analisados por um ensaio de qPCR utilizando o cobas® EGFR Mutation Test. Além disso, os eluatos de TNA do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit e os eluatos de RNA do método de extração de RNA de referência do laboratório foram analisados utilizando um ensaio de RT-qPCR com iniciadores HPRT1. Os resultados da amplificação dos testes EGFR Mutation e HPRT1 demonstraram concordância entre todas as amostras de TNA extraídas com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit e o DNA ou o RNA extraído com os respetivos métodos laboratoriais de referência.

11.D. Fluxo de trabalho de extração de DNA/RNA sequencial

O DNA e o RNA foram extraídos em eluatos separados de amostras de tecido FFPE humano de doze doadores individuais por dois dispositivos de teste, utilizando o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Sequential. As secções das mesmas doze amostras de tecido FFPE foram utilizadas para extrair DNA e RNA separadamente, utilizando os métodos de referência do laboratório clínico externo para a purificação de DNA e RNA, respetivamente.

Os eluatos de DNA resultantes do sistema Maxwell® CSC e o método de extração de DNA de referência do laboratório foram analisados por um ensaio de qPCR utilizando o cobas® EGFR Mutation Test. Os resultados da amplificação demonstraram a concordância entre todas as amostras de DNA extraídas com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit utilizando o fluxo de trabalho DNA/RNA Sequential e o método de extração de DNA de referência do laboratório, bem como entre os dois dispositivos de teste.

Do mesmo modo, os eluatos de RNA resultantes do Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit e o método de extração de RNA de referência do laboratório foram analisados num ensaio de RT-qPCR utilizando iniciadores HPRT1. Os resultados da amplificação demonstraram a concordância entre todas as amostras de RNA extraídas com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit utilizando o fluxo de trabalho DNA/RNA Sequential e o método de extração de RNA de referência do laboratório, bem como entre os dois dispositivos de teste.

12. Resolução de problemas

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

Sintomas

Concentração mais baixa do que a esperada de ácido nucleico (uma secção de tecido FFPE típica deve apresentar uma colheita de ácido nucleico amplificável dependendo do tamanho do tecido, celularidade, manuseamento e condição da fixação de formol).

Causas e observações

O desempenho do kit foi avaliado através do isolamento de ácidos nucleicos de um máximo de quatro secções de tecido FFPE com uma espessura máxima de secção de 20 µm. Utilize apenas secções que cumprem as especificações do tamanho.

O kit foi concebido para utilização com amostras de tecido FFPE. Não foi concebido para utilização com amostras de tecido não FFPE, como amostras de tecido frescas ou congeladas. As temperaturas e a duração de incubação foram testadas para garantir uma colheita ótima de ácido nucleico.

O kit não foi concebido para ser utilizado com amostras de tecido FFPE que tenham sido preparadas com fixadores diferentes do formol neutro tamponado a 10%. Verifique junto do laboratório de patologia ou do fornecedor para se certificar de que não foi utilizado um fixador alternativo.

O Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit não foi testado com lâminas ou secções de tecido FFPE com coloração. Repita a extração com uma secção ou lâmina sem coloração.

O desempenho do kit foi avaliado com base na amplificação e na quantificação baseada em corantes fluorescentes dos ácidos nucleicos extraídos. Outros métodos de quantificação, incluindo a absorvância, podem não estar correlacionados com as concentrações baseadas na amplificação e na fluorescência.

Podem ter sido introduzidas RNases ou DNases durante a quantificação ou o processamento da amostra. Consulte a Secção 13 para obter informações sobre a criação de um ambiente livre de ribonucleases.

O cocktail de DNase I foi adicionado ao cartucho para o fluxo de trabalho incorreto. O cocktail de DNase I só deve ser adicionado ao poço n.º 7 do cartucho para os fluxos de trabalho RNA e RNA Sequential.

O isopropanol não foi adicionado ao cartucho para o fluxo de trabalho adequado (RNA, TNA ou RNA Sequential), ou foi adicionado ao poço errado do cartucho.

Foi utilizado o método de extração Maxwell® incorreto no instrumento. Confirme que o método de extração Maxwell® utilizado corresponde à preparação do cartucho para o fluxo de trabalho utilizado.

12. Resolução de problemas (continuação)

Sintomas	Causas e observações
Concentração mais baixa do que a esperada de ácido nucleico (uma secção de tecido FFPE típica deve apresentar uma colheita de ácido nucleico amplificável dependendo do tamanho do tecido, celularidade, manuseamento e condição da fixação de formol). (continuação)	Não foi adicionada Nuclease-Free Water ou foi adicionado um volume incorreto aos tubos de eluição. O kit foi testado com um volume de eluição de 50 µl.
Qualidade mais baixa do que a esperada (o eluato contém ácidos nucleicos altamente fragmentados ou inibidores de ensaios a jusante).	<p>A(s) secção(ões) de tecido FFPE utilizada(s) para extração pode(m) conter ácidos nucleicos altamente fragmentados devido ao manuseamento ou às condições de fixação de formol. Se os ácidos nucleicos forem fragmentados antes do método de extração, o ácido nucleico fragmentado será purificado com este kit. Repita a extração com uma secção adjacente para avaliar se existe algum problema com a secção de tecido FFPE ou com o processo de extração.</p> <p>Alguns ensaios de amplificação são particularmente sensíveis aos inibidores. Os controlos de ensaios a jusante devem identificar a presença de um inibidor de amplificação no eluato. É da sua responsabilidade confirmar a compatibilidade deste produto com todos os ensaios de interesse a jusante.</p> <p>A presença de múltiplos tipos de ácidos nucleicos (DNA e RNA) num eluato pode causar competição em ensaios a jusante. Em caso de competição, otimize o ensaio para o analito de interesse.</p>
DNA presente nos eluatos de RNA, o que pode interferir com os ensaios a jusante.	<p>O cocktail de DNase I não foi adicionado ao cartucho para o fluxo de trabalho adequado (RNA ou RNA Sequencial), ou foi adicionado ao poço errado do cartucho. O cocktail de DNase I só deve ser adicionado ao poço n.º 7 do cartucho.</p> <p>O Elution Tube não foi removido do tabuleiro de plataforma e substituído por um novo tubo de eluição e tampão de eluição ao executar o fluxo de trabalho DNA/RNA Sequencial.</p>
RNA presente nos eluatos de DNA, o que pode interferir com os ensaios a jusante.	Os eluatos de DNA podem ser tratados com RNase para remover qualquer RNA presente nas amostras de DNA, se for necessário DNA livre de RNA.
O método de DNA é acidental ou intencionalmente abortado durante o fluxo de trabalho DNA/RNA Sequencial.	As amostras de RNA podem ser recuperadas através da utilização do cartucho com o método Maxwell® CSC XtractAll FFPE RNA.

Sintomas	Causas e observações
Transporte de resina para os eluatos.	<p>Foi transferido tecido FFPE não digerido para o cartucho. Se, no final da incubação de 1 hora (secção 5.A), permanecer algum tecido FFPE não digerido, centrifugue os tubos de amostra a 10.000 × g durante 20 segundos para precipitar qualquer material não digerido. Não transfira qualquer material precipitado ou não digerido para o cartucho.</p> <p>Alguns transportes de resina são normais e não afetam 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 14, Produtos relacionados.</p>
Manchas castanhas de resina nas paredes dos tubos de eluição.	<p>Material de amostra ou parafina residual aderido à parede do tubo durante o processamento. Estas manchas são normais, variam consoante a composição da amostra (por exemplo, número de secções encaracoladas, teor de parafina) e não afetam a qualidade do eluato ou o desempenho a jusante.</p>
O volume de eluição recuperado é demasiado pequeno ou demasiado grande para ser utilizado em ensaios a jusante.	<p>Os volumes de eluição de 30–100 µl foram testados com o Maxwell® CSC XtractAll FFPE DNA/RNA Kit e tiveram um bom desempenho.</p>

Qualquer incidente grave que ocorra relacionado com o dispositivo que tenha conduzido, ou possa conduzir, a morte ou ferimentos graves de um utilizador ou paciente, deverá ser comunicado imediatamente ao fabricante. Os utilizadores que se encontrem na União Europeia também deverão reportar incidentes graves à Autoridade Competente no país onde o utilizador e/ou o paciente se encontrem.

13. Criar um ambiente livre de ribonucleases

As ribonucleases são extremamente difíceis de tornar inativas. Tenha cuidado para evitar introduzir atividade de RNase nas suas amostras de RNA durante ou após o isolamento. Esta observação é extremamente importante caso o material de base esteja apenas disponível numa quantidade limitada. As notas seguintes podem ajudar a evitar uma contaminação de RNase acidental das suas amostras.

1. Duas das mais importantes fontes de contaminação de RNase são as mãos do utilizador e as bactérias ou fungos que possam estar presentes nas partículas de pó suspensas no ar. Para evitar a contaminação a partir destas fontes, utilize uma técnica asséptica durante o manuseamento dos reagentes fornecidos com este sistema. Use sempre luvas. Troque de luvas sempre que possa ter entrado em contacto com as ribonucleases.
2. Sempre que possível, utilize material plástico descartável e esterilizado para o manuseamento de RNA. Estes materiais são geralmente livres de RNases e não necessitam de pré-tratamento para tornar a RNase inativa.

13. Criar um ambiente livre de ribonucleases (continuação)

- Trate o material plástico e o material em vidro não esterilizado antes da respetiva utilização para se certificar de que estão livres de RNases. Deixe o material em vidro na estufa a 200 °C de um dia para o outro e lave muito bem o material plástico com 0,1 N NaOH, 1 mM EDTA, seguido de água livre de RNases. Também podem ser utilizados produtos para a remoção de RNases disponíveis no mercado, seguindo as instruções do fabricante.
- Trate as soluções que não são fornecidas com o sistema, adicionando dietilpirocarbonato (DEPC) a 0,1% numa hotte. Incube de um dia para o outro com agitação à temperatura ambiente na hotte. Coloque na autoclave durante 30 minutos para remover qualquer vestígio de DEPC.

Atenção: o DEPC é suspeito de ser cancerígeno e deve ser utilizado apenas numa hotte química. O DEPC reage rapidamente com aminas e não pode ser utilizado para tratar tampões de Tris.

Nota: para todas as aplicações a jusante, é essencial que continue a proteger as suas amostras de RNA de RNases.

14. Produtos relacionados

Instrumento e acessórios

Produto	Tamanho	Cat.#
Maxwell® CSC Instrument*	1 de cada	AS6000
Maxwell® CSC 48 Instrument*	1 de cada	AS8000
Maxwell® RSC/CSC Deck Tray	1 de cada	SP6019
Maxwell® RSC/CSC 48 Front Deck Tray	1 de cada	AS8401
Maxwell® RSC/CSC 48 Back Deck Tray	1 de cada	AS8402
Microtube, 1,5 ml	1000/pack	V1231
Elution Magnet, 16 Posições	1 de cada	AS4017
Elution Magnet, 24 Posições	1 de cada	AS4018

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

Maxwell® CSC Reagent Kits

Visite www.promega.com para obter uma lista dos kits de reagentes Maxwell® CSC disponíveis.

© 2025 Promega Corporation. All Rights Reserved.

A Maxwell é uma marca comercial registada da Promega Corporation

cobas é uma marca comercial registada da Roche Diagnostics Operations, Inc.

Os produtos podem estar cobertos por patentes pendentes ou por patentes emitidas ou podem ter algumas limitações. Visite o nosso website 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 aceda ao catálogo da Promega online para obter as informações mais recentes acerca dos produtos da Promega.