



Clean Cell Free DNA Kit

Instruções de Utilização

V. 2 - FEVEREIRO DE 2024



REF CCF-D0384



CleanNA, Coenecoop 75, 2741 PH, Waddinxveen, Países Baixos

Destinado a utilização em diagnóstico *in vitro*.

As informações contidas neste documento estão sujeitas a alterações sem aviso prévio. Visite regularmente www.cleanna.com/download-ccf para verificar a existência de atualizações neste documento.

Exoneração de responsabilidade

A CleanNA rejeita todas as garantias no que respeita a este documento, expressas ou implícitas, incluindo, entre outras, as de comercialidade ou adequabilidade para um determinado fim. Na medida do permitido por lei, em nenhuma circunstância a CleanNA será responsável, quer por disposições contratuais, responsabilidade civil, garantia ou ao abrigo de qualquer estatuto ou com base em quaisquer outros fundamentos, por danos especiais, acidentais, indiretos, punitivos, múltiplos ou consequentes em ligação com o, ou resultantes do, presente documento, incluindo, mas não limitados à utilização do mesmo, sejam ou não previsíveis e quer a CleanNA tenha alertado ou não para a possibilidade de tais danos.

Marcas comerciais

As marcas comerciais mencionadas no presente documento são propriedade dos respetivos titulares.

Contacto

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Países Baixos | T: +31 (0) 182 22 33 50
F: +31 (0) 182 22 33 98 | info@cleanna.com | www.cleanna.com

Índice

Finalidade prevista.....	4
Utilizadores previstos.....	4
Introdução e princípio.....	4
Síntese esquemática.....	5
Materiais fornecidos.....	6
Expedição, armazenamento e manuseamento dos reagentes	6
Advertências	7
Precauções	8
Controlo de qualidade	10
Limitações	10
Colheita e armazenamento de espécimes	11
Materiais e equipamento a serem fornecidos pelo utilizador	12
Preparação de reagentes.....	13
Clean Cell Free DNA Kit - Protocolo de tubo individual.....	14
Clean Cell Free DNA Kit - Protocolo com placa de 48 poços	17
Guia para a resolução de problemas	21
Símbolos	23
Informações para encomenda.....	24
Histórico de revisões do documento	24
Notas	25

Finalidade prevista

O dispositivo tem como finalidade prevista a extração de ADN livre circulante (ADNlc) a partir de plasma humano, com uma pureza suficiente para ser utilizado em procedimentos de detecção a jusante baseados no princípio de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Utilizadores previstos

Os utilizadores previstos são profissionais de laboratório com formação em técnicas de biologia molecular.

Introdução e princípio

O Clean Cell Free DNA Kit foi concebido para o isolamento de ADN livre a partir de plasma humano. Todo o procedimento permite o processamento manual, bem como automatizado, de amostras.

Ao combinar o nosso exclusivo sistema de tampão com a comodidade das nossas partículas magnéticas CleanNA CCF, é eliminada a necessidade de etapas de vácuo ou de funis ao longo do procedimento. Como resultado, o Clean Cell Free DNA Kit proporciona um processo simples de 4 etapas: lise, ligação, lavagem e eluição.

As nossas partículas CleanNA CCF proporcionam uma elevada capacidade de ligação, e, combinadas com o sistema de tampão, visam fragmentos de ADN mais pequenos (120-400 bp). Esta combinação minimiza o risco de contaminação do ADN genómico. A elevada capacidade de ligação das partículas CleanNA CCF diminui a quantidade de partículas necessárias durante as etapas de ligação, reduzindo, desta forma, o volume de eluição. Isto permite que o ADN livre isolado a partir de 1 ml de plasma seja eluído em 30-60 µl.

O ADN livre isolado fica pronto para ser utilizado em PCR(q) como aplicação a jusante.

Síntese esquemática

O tampão de lise exclusivamente formulado liberta o ADN circulante de proteínas e vacúolos ligados ao ADN enquanto as DNases são inativadas. O ADN é isolado a partir do lisado numa etapa, através de ligação com a superfície das partículas magnéticas. Em seguida, as partículas magnéticas são separadas do lisado utilizando-se um dispositivo de separação magnética. Após algumas etapas de lavagem rápidas, destinadas a remover contaminantes, o ADN purificado é eluído das partículas CleanNA utilizando-se um tampão de eluição.

Adicionar esferas

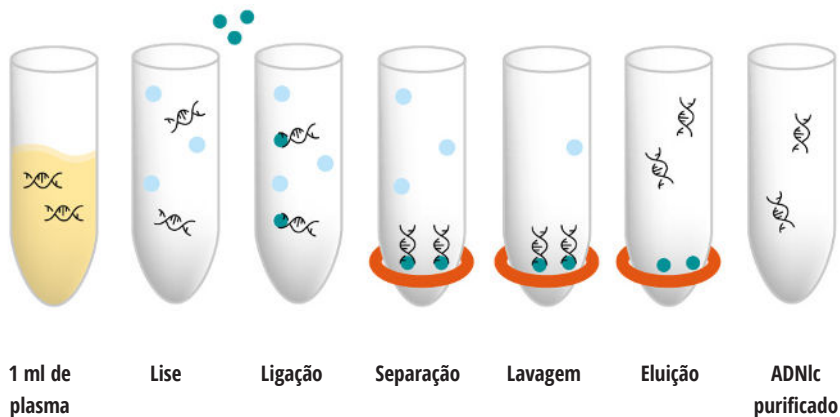


Figura 1: Síntese esquemática do procedimento com o Clean Cell Free DNA Kit.

Materiais Fornecidos

Conteúdo do kit:

Componente	Volume CCF-D0384
CCF Lysis	30 ml
CCF Binding	430 ml
CCF Wash 1	2 x 225 ml
ICCF Wash 2	2 x 45 ml
Elution Buffer	100 ml
Proteinase K Solution	6,5 ml
CleanNA Particles CCF	4,3 ml

Expedição, armazenamento e manuseamento dos reagentes

A expedição do Clean Cell Free DNA Kit deve ser efetuada à temperatura ambiente (15-25 °C). Não congele os componentes do Clean Cell Free DNA Kit.

Componente	Armazenamento
CCF Lysis*	Temperatura ambiente (15-25 °C)
CCF Binding	Temperatura ambiente (15-25 °C)
CCF Wash 1	Temperatura ambiente (15-25 °C)
ICCF Wash 2	Temperatura ambiente (15-25 °C)
Elution Buffer	Temperatura ambiente (15-25 °C)
Proteinase K Solution	Temperatura ambiente (15-25 °C) (para armazenamento por um período > 12 meses, conserve a 2-8 °C)
CleanNA Particles CCF	2-8 °C

* Caso o tampão de lise apresente um precipitado branco no frasco, proceda ao pré-aquecimento do tampão a 37 °C para dissolver o precipitado.

Estabilidade durante a utilização: após abertura do Clean Cell Free DNA Kit, o produto pode ser utilizado em segurança por um período de 19 dias.

Não utilize o Clean Cell Free DNA Kit após o prazo de validade indicado no rótulo da caixa exterior.

Advertências

Leia atentamente as instruções antes de utilizar o kit.

Não misture kits com diferentes números de lote.

Certifique-se de que os frascos do kit não apresentam danos nem fugas de líquidos. Não utilize um kit que tenha sofrido danos.

O número de lote indicado na embalagem de CleanNA Particles CCF é diferente do número de lote indicado no frasco de CleanNA Particles CCF. O número de lote indicado na caixa corresponde ao número de lote de todo o kit, e o número de lote indicado nos frascos é específico das partículas. Como as CleanNA Particles CCF são armazenadas a uma temperatura diferente, antes da utilização certifique-se de que o número de lote indicado na caixa das partículas corresponde ao número de lote do kit.

Qualquer incidente grave ocorrido em relação com o dispositivo deve ser comunicado ao fabricante e à autoridade competente do Estado-Membro no qual o utilizador e/ou doente está estabelecido.

Precauções

Para todas as informações de segurança, consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS).
Solicite o seu FDS através de cleanna.com/sds-request.

CCF Binding



Líquido e vapor inflamáveis. Provoca lesões oculares graves. Nocivo por ingestão. Provoca irritação cutânea. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.



Manter afastado do calor, superfícies quentes, faísca, chama aberta e outras fontes de ignição. Não fumar. Manter o recipiente bem fechado. Usar luvas de proteção, vestuário de proteção, proteção ocular e proteção facial. Ligação à terra/equipotencial do recipiente e do equipamento recetor. Utilizar equipamento elétrico/de ventilação/de iluminação/intrinsecamente seguro à prova de explosão. Utilizar ferramentas antichispa. Tomar medidas para evitar acumulação de cargas eletrostáticas. Lavar cuidadosamente todas as áreas corporais exteriores expostas pós manuseamento. Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto. Evitar a libertação para o ambiente.



SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico/socorrista.

Em caso de incêndio: para extinguir utilizar espuma resistente a álcool ou espuma proteica normal.

EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico/socorrista.

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com água e sabão.

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água [ou tomar um duche].

Enxaguar a boca.

Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

CCF Lysis



Nocivo para os organismos aquáticos. Provoca lesões oculares graves. Provoca irritação cutânea.

Usar luvas de proteção/vestuário de proteção/proteção ocular/proteção facial. Evitar a libertação para o ambiente.

SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

Contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com água e sabão.

Em caso de irritação cutânea: consulte um médico.

CCF Wash 1



Nocivo por ingestão. Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros. Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos.



Não respirar as névoas/vapores/aerossóis. Lavar cuidadosamente todas as áreas corporais exteriores expostas pós manuseamento. Usar luvas de proteção, vestuário de proteção, proteção ocular e proteção facial. Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto. Evitar a libertação para o ambiente.

EM CASO DE INGESTÃO: Enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito.

SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE (ou o cabelo): retirar imediatamente toda a roupa contaminada. Enxaguar a pele com água [ou tomar um duche].

SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico/socorrista.

Lavar a roupa contaminada antes de a voltar a usar.

EM CASO DE INGESTÃO: caso sinta indisposição, contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS/médico/socorrista.

EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a pessoa para uma zona ao ar livre e mantê-la numa posição que não dificulte a respiração.

Proteinase K Solution



Quando inalado, pode provocar sintomas de alergia ou de asma ou dificuldades respiratórias.

Evitar respirar as névoas/vapores/aerossóis. Em caso de ventilação inadequada, usar proteção respiratória.

EM CASO DE INALAÇÃO: Retirar a vítima para uma zona ao ar livre e mantê-la em repouso numa posição que não dificulte a respiração.

Em caso de sintomas respiratórios: contacte um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico.

Nota: Para eliminação segura, consulte os seus regulamentos locais relativos a resíduos.

Controlo de qualidade

A CleanNA produz cada lote do Clean Cell Free DNA Kit de acordo com protocolos predeterminados e validados no Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ).

Adicionalmente, é realizada uma verificação de qualidade após a produção de cada lote, de modo a garantir a consistência da qualidade do produto. O SGQ da CleanNA está certificado de acordo com a norma EN-ISO 13485.

Limitações

O desempenho do Clean Cell Free DNA Kit foi determinado com plasma humano preservado nos seguintes anticoagulantes:

- EDTA
- Citrato-fosfato-dextrose (CPD)
- Citrato de sódio

Na avaliação do desempenho foram incluídos vários dadores de plasma individuais. O desempenho do Clean Cell Free DNA Kit não foi testado com plasma hemolisado.

É da responsabilidade do utilizador validar o desempenho de materiais de amostra não utilizados na avaliação do desempenho.

Recomendamos a utilização de um controlo de extração interno por amostra, para identificar um falso resultado negativo em métodos de deteção a jusante, causado por agentes desconhecidos potencialmente inibidores em amostras de plasma de doentes individuais.


O desempenho do kit foi determinado com métodos de deteção a jusante baseados em Reação em Cadeia da Polimerase. É da responsabilidade do utilizador validar o desempenho do dispositivo quando utilizado com outros métodos de deteção a jusante.

Os resultados de diagnóstico obtidos através da utilização do Clean Cell Free DNA Kit têm de ser interpretados em conjunto com outros achados clínicos ou laboratoriais.

Colheita e armazenamento de espécimes

Plasma

O procedimento de isolamento do ácido nucleico deve ter início imediatamente após a doação de sangue e separação do plasma*. Caso isto não seja possível, o plasma pode ser armazenado por um período máximo de 24 horas a 2-8 °C, para armazenamento de curta duração, e, para armazenamento por períodos mais longos, o plasma pode ser armazenado por um período máximo de 4 semanas a -20 °C ou -80 °C. Descongele as amostras de plasma à temperatura ambiente antes de as utilizar para extração de ADN livre.

 **Nota:** as amostras de origem humana são potencialmente infecciosas. Adote medidas apropriadas ao manusear as mesmas.

* Para preparação do plasma antes do isolamento de ácido nucleico livre a partir de amostras de sangue, recomendamos o seguinte procedimento:

1. Agite os tubos de sangue total centrifugando-os durante 10 minutos a 3000 rpm (1900 x g) a 4 °C.
2. Aspire cuidadosamente o sobrenadante de plasma, sem perturbar as células sanguíneas.
3. Transfira o sobrenadante de plasma para um novo tubo de centrifugação.
4. Para garantir que o plasma não contém células sanguíneas nucleadas, repita os passos 1 a 3 para uma segunda separação.
5. O plasma pode ser utilizado para extração de ácido nucleico nesta etapa.

Execute os passos 6-9 indicados abaixo para também remover cromatina intacta de células sanguíneas destruídas do plasma. Note que isto também pode remover uma pequena quantidade de ADNIc que esteja presente em veículos extracelulares de maiores dimensões. Caso contrário, avance para o passo 10.

6. Centrifugue as amostras de plasma 16 000 x g a 4 °C, utilizando um rotor de ângulo fixo.
7. Remova cuidadosamente o sobrenadante de plasma, certificando-se de que não perturba o sedimento.
8. Transfira o plasma para um novo tubo.
9. O plasma pode agora ser utilizado para extração de ácido nucleico.
10. Armazene o plasma de acordo com as instruções apresentadas acima.

Materiais e equipamento a serem fornecidos pelo utilizador

Para isolamento em tubos individuais

Materiais e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador para o protocolo de tubos com um máximo de 1 ml de amostra:

- Etanol absoluto fresco
- Dispositivo de separação magnética para tubos de 1,5/2,0 ml
- Misturador do tipo vórtex
- Agitador ou balancim de laboratório
- Incubadora com capacidade de regulação de temperatura até aos 60 °C
- Tubo(s) de microcentrifuga de 1,5 ml
- Tubo(s) de centrifuga de 15 ml

Para isolamento utilizando o formato de placa de 48 poços

Materiais e reagentes a serem fornecidos pelo utilizador para o protocolo de placa com um máximo de 1 ml de amostra:

- Etanol absoluto fresco
- Placa magnética de 48 poços, por exemplo, Alpaqua, Ref.^a A000530
- Misturador do tipo vórtex
- Agitador ou balancim de laboratório
- Incubadora com capacidade de regulação de temperatura até aos 60 °C
- Placa(s) de 48 poços profundos, 3,5 ml; por exemplo, Wuxi NEST Biotechnology, Ref.^a 504102
- Placa(s) de 96 poços profundos ou placa(s) de PCR de 96 poços

Preparação de reagentes

ICCF Wash 2

Dilua o reagente CCF Wash 2 com etanol absoluto fresco, conforme indicado a seguir, e armazene à temperatura ambiente.

Kit	Etanol absoluto a adicionar
CCF-D0384	180 ml

Clean Cell Free DNA Kit - Protocolo de tubo individual

Antes de começar:

- Regule a incubadora para 60 °C.
- Certifique-se de que o reagente CCF Lysis está completamente dissolvido. Caso não esteja, proceda ao pré-aquecimento do mesmo a 37 °C.
- Utilizando um agitador de laboratório ou misturador do tipo vórtex, misture as CleanNA Particles CCF para as voltar a suspender totalmente antes da utilização.
- Prepare o reagente CCF Wash 2 de acordo com as instruções apresentadas na secção «Preparação de reagentes» na página 13.

Protocolo:

1. Adicione até 1 ml de amostra de plasma a um tubo de centrífuga de 15 ml (não fornecido).

⚠ Nota: não exceda o volume máximo da amostra, pois isso diminuirá a eficiência do procedimento de extração.

2. Se o volume da amostra for inferior a 1 ml, aumente o volume da amostra até 1 ml utilizando o Elution Buffer (fornecido com este kit).
3. Adicione 15 µl de Proteinase K Solution.
4. Adicione 67 µl de CCF Lysis.
5. Agite no misturador do tipo vórtex à velocidade máxima, ou pipete para cima e para baixo, para misturar completamente.
6. Incube a 60 °C durante 20 minutos. Misture por inversão ou agitação a cada 10 minutos.
7. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos.

⚠ Nota: este passo de incubação é crucial para permitir que a temperatura da amostra baixe e obter a ligação mais eficiente do ADN com as CleanNA Particles CCF.

8. Adicione 1 ml de CCF Binding. Agite no misturador do tipo vórtex à velocidade máxima durante 30 segundos, ou pipete para cima e para baixo, para misturar completamente.
9. Adicione 10 µl de CleanNA Particles CCF. Inverta a amostra 10 vezes, ou pipete para cima e para baixo, para misturar.

⚠ Nota: utilizando um agitador de laboratório ou misturador do tipo vórtex, misture as CleanNA Particles CCF para as voltar a suspender totalmente antes da utilização.

10. Incube durante 10 minutos à temperatura ambiente com mistura contínua. A amostra tem de ser misturada ao longo do período de incubação de 10 minutos, utilizando um agitador ou balancim de laboratório.

⚠ Nota: não misture num misturador do tipo vórtex com velocidades elevadas, pois tal causará a formação de espuma, resultando em redução do rendimento. A velocidade da mistura deve ser ajustada por forma a manter as CleanNA Particles CCF ressuspensas na solução.

11. Transfira 1 ml da mistura para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml (não fornecido).
12. Coloque o tubo num dispositivo de separação magnética para magnetizar as CleanNA Particles CCF.
13. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

Nota: certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.

14. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

Nota: não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.

15. Transfira a mistura restante após o passo 11 para o tubo de microcentrífuga de 1,5 ml utilizado nos passos anteriores.
16. Coloque o tubo num dispositivo de separação magnética para magnetizar as CleanNA Particles CCF.
17. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

Nota: certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.

18. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

Nota: não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.

19. Retire o tubo contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.
20. Adicione 500 µl de CCF Wash 1.
21. Volte a suspender as CleanNA Particles CCF, agitando no misturador do tipo vórtex durante 2 minutos, ou pipetando para cima e para baixo 20 vezes.

Nota: para obter uma boa pureza, é crucial ressuspender completamente as CleanNA Particles CCF.

22. Coloque o tubo no dispositivo de separação magnética para magnetizar as CleanNA Particles CCF.
23. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

Nota: certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.


24. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

Nota: não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.


25. Repita os passos 19-24 para um segundo passo de lavagem com CCF Wash 1.
26. Retire o tubo contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.
27. Adicione 500 µl de CCF Wash 2.

Nota: o CCF Wash 2 tem de ser diluído com etanol absoluto antes da utilização. Consulte as instruções na página 13.


28. Volte a suspender as CleanNA Particles CCF, agitando no misturador do tipo vórtex durante 2 minutos, ou pipetando para cima e para baixo 20 vezes.
29. Coloque o tubo no dispositivo de separação magnética para magnetizar as CleanNA Particles CCF.
30. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

 **Nota:** certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.


31. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

 **Nota:** não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.


32. Repita os passos 26-31 para um segundo passo de lavagem com CCF Wash 2.
33. Retire o tubo do dispositivo de separação magnética durante cerca de 30 segundos.
34. Coloque o tubo no dispositivo de separação magnética para magnetizar as CleanNA Particles CCF.

 **Nota:** certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.


35. Aspire e elimine o CCF Wash 2 residual.

 **Nota:** não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.

36. Deixe o tubo aberto no dispositivo de separação magnética durante 25 minutos, para secar as CleanNA Particles CCF.
37. Retire o tubo contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.
38. Adicione 30-60 µl de Elution Buffer. Volte a suspender as CleanNA Particles CCF, agitando no misturador do tipo vórtex ou pipetando para cima e para baixo 20 vezes.

 **Nota:** certifique-se de que o tampão de eluição cobre as CleanNA Particles CCF. Volumes de eluição demasiado baixos podem causar uma redução do rendimento. Volumes demasiado altos causam uma redução da concentração de ADN no eluato.

39. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos, agitando constantemente no misturador do tipo vórtex.
40. Coloque o tubo no dispositivo de separação magnética para magnetizar as CleanNA Particles CCF.
41. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

 **Nota:** certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução, a transferência de microesferas pode causar inibição durante a PCR a jusante.

42. Transfira o sobrenadante limpo contendo ADN purificado para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 ml (não fornecido).
43. Armazene os ácidos nucleicos livres extraídos a -20 °C.

Clean Cell Free DNA Kit - Protocolo com placa de 48 poços

Antes de começar:

- Regule a incubadora para 60 °C.
- Certifique-se de que o reagente CCF Lysis está completamente dissolvido. Caso não esteja, proceda ao pré-aquecimento do mesmo a 37 °C.
- Utilizando um agitador de laboratório ou misturador do tipo vórtex, misture as CleanNA Particles CCF para as voltar a suspender totalmente antes da utilização.
- Prepare o reagente CCF Wash 2 de acordo com as instruções apresentadas na secção «Preparação de reagentes» na página 13.

Protocolo:

1. Adicione até 1 ml de amostras de plasma/soro numa placa de 48 poços profundos (não fornecida).

Nota: não exceda o volume máximo da amostra, pois isso diminuirá a eficiência do procedimento de extração.

2. Se o volume da amostra for inferior a 1 ml, aumente o volume da amostra até 1 ml utilizando o Elution Buffer (fornecido com este kit).
3. Adicione 15 µl de Proteinase K Solution.
4. Adicione 67 µl de CCF Lysis e sele a placa.
5. Agite no misturador do tipo vórtex à velocidade máxima, ou pipete para cima e para baixo, para misturar completamente.
6. Incube a 60 °C durante 20 minutos. Misture por inversão ou agitação a cada 10 minutos.
7. Incube à temperatura ambiente durante 10 minutos.

Nota: este passo de incubação é crucial para permitir que a temperatura da amostra baixe e obter a ligação mais eficiente do ADN com as CleanNA Particles CCF.


8. Adicione 1 ml de CCF Binding. Agite no misturador do tipo vórtex à velocidade máxima durante 30 segundos, ou pipete para cima e para baixo, para misturar completamente.
9. Adicione 10 µl de CleanNA Particles CCF. Inverta as amostras 10 vezes, ou pipete para cima e para baixo, para misturar.

Nota: utilizando um agitador de laboratório ou misturador do tipo vórtex, misture as CleanNA Particles CCF para as voltar a suspender totalmente antes da utilização.


10. Incube durante 10 minutos à temperatura ambiente com mistura contínua. As amostras têm de ser misturadas ao longo do período de incubação de 10 minutos, utilizando um agitador ou balancim de laboratório.

Nota: não misture num misturador do tipo vórtex com velocidades elevadas, pois tal causará a formação de espuma, resultando em redução do rendimento. A velocidade da mistura deve ser ajustada por forma a manter as CleanNA Particles CCF ressuspensas na solução.


11. Coloque a placa de 48 poços profundos na placa magnética de 48 poços para magnetizar as CleanNA Particles CCF. As partículas contidas em cada poço serão recolhidas pelos ímãs existentes na parte de baixo.
12. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

 **Nota:** certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.


13. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

 **Nota:** não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.


14. Retire a placa de 48 poços contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.
15. Adicione 500 µl de CCF Wash 1.
16. Volte a suspender as CleanNA Particles CCF, agitando no misturador do tipo vórtex durante 2 minutos, ou pipetando para cima e para baixo 20 vezes.

 **Nota:** para obter uma boa pureza, é crucial ressuspender completamente as CleanNA Particles CCF.


17. Transfira as CleanNA Particles CCF ressuspensas para uma nova placa de 48 poços profundos (não fornecida).

 **Nota:** continue a trabalhar no formato de 48 poços durante o resto do procedimento.


18. Coloque a placa de 48 poços profundos na placa magnética de 48 poços para magnetizar as CleanNA Particles CCF.
19. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

 **Nota:** certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.


20. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

 **Nota:** não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.

21. Retire a placa de 48 poços contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.
22. Adicione 500 µl de CCF Wash 1.
23. Volte a suspender as CleanNA Particles CCF, agitando no misturador do tipo vórtex durante 2 minutos, ou pipetando para cima e para baixo 20 vezes.

 **Nota:** para obter uma boa pureza, é crucial ressuspender completamente as CleanNA Particles CCF.

24. Coloque a placa de 48 poços profundos na placa magnética de 48 poços para magnetizar as CleanNA Particles CCF.
25. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

- 18  **Nota:** certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.

26. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

⚠ Nota: não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.

27. Retire a placa de 48 poços contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.

28. Adicione 500 µl de CCF Wash 2.

⚠ Nota: o CCF Wash 2 tem de ser diluído com etanol absoluto antes da utilização. Consulte as instruções na página 13.

29. Volte a suspender as CleanNA Particles CCF, agitando no misturador do tipo vórtex durante 2 minutos, ou pipetando para cima e para baixo 20 vezes.

30. Coloque a placa de 48 poços profundos na placa magnética de 48 poços para magnetizar as CleanNA Particles CCF.

31. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

⚠ Nota: certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.

32. Aspire e elimine o sobrenadante limpo.

⚠ Nota: não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.

33. Repita os passos 28-32 para um segundo passo de lavagem com CCF Wash 2.

34. Retire a placa de 48 poços contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.

35. Coloque a placa de 48 poços profundos na placa magnética de 48 poços para magnetizar as CleanNA Particles CCF.

⚠ Nota: certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução; a perda de microesferas pode causar uma redução do rendimento.

36. Aspire e elimine o CCF Wash 2 residual.

⚠ Nota: não perturbe nem pipete as CleanNA Particles CCF. Isto pode causar uma redução do rendimento.

37. Deixe o tubo no dispositivo de separação magnética durante 25 minutos, para secar as CleanNA Particles CCF.

38. Retire a placa de 48 poços contendo as CleanNA Particles CCF do dispositivo de separação magnética.


39. Adicione 30-60 µl de Elution Buffer. Volte a suspender as CleanNA Particles CCF, agitando no misturador do tipo vórtex ou pipetando para cima e para baixo 20 vezes.

⚠ Nota: certifique-se de que o tampão de eluição cobre as CleanNA Particles CCF. Volumes de eluição demasiado baixos podem causar uma redução do rendimento. Volumes demasiado altos causam uma redução da concentração de ADN no eluato.

40. Incube à temperatura ambiente durante 5 minutos, agitando constantemente no agitador ou misturador do tipo vórtex, ou pipetando.

41. Coloque a placa de 48 poços profundos na placa magnética de 48 poços para magnetizar as CleanNA Particles CCF.

42. Incube à temperatura ambiente até as CleanNA Particles CCF terem sido completamente removidas da solução.

 **Nota:** certifique-se de que incuba até todas as partículas terem sido removidas da solução, a transferência de microesferas pode causar inibição durante a PCR a jusante.

43. Transfira o sobrenadante limpo contendo ADN purificado para uma nova placa de 96 poços ou para tubos individuais limpos (não fornecidos).

44. Armazene os ácidos nucleicos livres extraídos a -20 °C.

Guia para a resolução de problemas









Utilize este guia para solucionar eventuais problemas que possam ocorrer. Para obter assistência adicional, contacte o seu distribuidor local.

Possíveis problemas e sugestões

Problema	Causa	Sugestão
Baixo rendimento de ADN	Ressuspensão incompleta das CleanNA Particles CCF.	Volte a suspender as CleanNA Particles CCF agitando vigorosamente num misturador do tipo vórtex antes da utilização.
	Ligação ineficiente do ADN às CleanNA Particles CCF.	Certifique-se de que deixa arrefecer a amostra à temperatura ambiente durante 10 minutos antes de adicionar o reagente CCF Binding.
		Certifique-se de que mistura continuamente cada amostra ao longo da incubação da ligação.
	Perda de CleanNA Particles CCF durante a operação.	Evite perturbar as CleanNA Particles CCF durante a aspiração.
	O ADN permanece ligado às CleanNA Particles CCF.	Dilua o reagente CCF Wash 2, adicionando o volume apropriado de etanol absoluto antes da utilização (consulte as instruções na página 13).
		Certifique-se de que o tampão de eluição cobre todas as CleanNA Particles CCF.
Transferência de etanol.	Antes da eluição, seque as CleanNA Particles CCF à temperatura ambiente durante 25 minutos.	
As CleanNA partículas CCF não são completamente eliminadas da solução	Tempo de magnetização demasiado curto.	Aumente o tempo de recolha no dispositivo de separação magnética.
Co-purificação de elevado peso molecular	Têm de ser realizados dois passos de lavagem com o reagente CCF Wash 1.	Realize dois passos de lavagem com o reagente CCF Wash 1, conforme indicado nas Instruções de Utilização. Aumente o volume de tampão de lavagem, se necessário.
Problemas em aplicações a jusante	Transferência de sais.	O reagente CCF Wash 2 tem de estar à temperatura ambiente.

Dados anómalos do bionalisador	O bionalisador apresenta vários picos acentuados durante a análise.	Certifique-se de que remove todos os vestígios do sobrenadante limpo após cada passo de lavagem.
		Certifique-se de que incuba o tubo/placa durante 25 minutos, para secar as CleanNA Particles CCF.
	Bionalisador apresenta uma linha de base que aumenta na parte final.	Verifique se a placa do bionalisador contém bolhas de ar. Carregue as amostras numa placa preparada de novo.
	O bionalisador apresenta uma mancha acentuada no início do traçado.	Certifique-se de que a amostra purificada não contém vestígios de CleanNA particles CCF.

Símbolos

	Diagnóstico <i>in vitro</i>
	Marcação CE. Este produto cumpre os requisitos para dispositivos CE-IVD ao abrigo do Regulamento Europeu dos Dispositivos Médicos para Diagnóstico <i>in Vitro</i> (2017/746)
	Referência para encomenda
	Fabricante
	Atenção
	Limite de temperatura
	Prazo de validade
	Número de lote

Informações para encomenda

Para encomendar, contacte o seu distribuidor local.

Produto	Referência
Clean Cell Free DNA Kit (384 prep.)	CCF-D0384

Histórico de revisões do documento

Versão do manual	Data da revisão	Capítulo revisto	Explicação da revisão
1	2023/OUT/02	N/A	Versão inicial
2	2024/FEB/08	Primeira página e Síntese esquemática.	Atualização no link para o site e visão esquemática.

Notas

Notas

Notas

Contacto

Coenecoop 75 | 2741 PH Waddinxveen | Países Baixos

T: +31 (0) 182 22 33 50 | F: +31 (0) 182 22 33 98 | info@cleanna.com

www.cleanna.com

