



Extração de DNA/RNA Viral

Instruções de uso
Instrucciones de uso
Usage instructions

ÍNDICE

Finalidade	3
Princípio de Ação	3
Apresentação	3
Reagentes	4
Equipamentos e Insumos Operacionais	4
Condições de Armazenamento e Transporte	4
Cuidados Especiais	5
Amostras	5
Procedimento	6
A . Preparo das Soluções de Trabalho	6
B . Extração do DNA/RNA	6
B.1 Protocolo para 200 µL de volume de amostra	6
1. Lise das Amostras	6
2. Ligação	7
3. Lavagem	7
4. Eluição	7
B.2 Protocolo para 400 µL de volume de amostra	8
1. Lise das Amostras	8
2. Ligação	8
3. Lavagem	8
4. Eluição	9
Limitações do Processo	9
Referências Bibliográficas	9
Atendimento ao Consumidor	9
Simbologia Universal	10

FINALIDADE

Produto desenvolvido para a extração e purificação de DNA/RNA viral de amostras de soro, plasma ou outros fluidos biológicos.

Os ácidos nucleicos obtidos podem ser utilizados para variadas aplicações como PCR, RT-PCR, hibridização, sequenciamento, etc.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O kit **Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral** é um produto desenvolvido para o isolamento e purificação de DNA/RNA viral de amostras biológicas. O método utilizado é a extração por membrana de sílica. O processo é realizado em 4 etapas: 1) Lise celular: rompimento celular para liberação dos ácidos nucleicos; 2) Ligação: ligação seletiva do ácido nucleico à membrana de sílica; 3) Lavagem: retirar as impurezas residuais; 4) Eluição: liberação do ácido nucleico da membrana de sílica. No final do processo, temos o ácido nucleico concentrado e com alta pureza.

Reagente	Apresentação 50 preparações
R1	25 mL
R2	30 mL
R3	12 mL
R4	13 mL
R5	2 x 300 µg
R6	600 µL
R7	50 unid.
R8	150 unid.
R9	100 unid.

REAGENTES

R1. Tampão de Lise: Hidrocloreto de guanidina.

R2. Lavagem 1: Hidrocloreto de guanidina, TRIS-HCl.

R3. Lavagem 2: TRIS-HCl, SDS.

R4. Água Livre de RNase.

R5. Carrier RNA: Ácido poliadenílico (Liofilizado).

R6. Proteinase K: Enzima proteinase K.

R7. Colunas: Tubo de polipropileno com membrana de sílica.

R8. Tubos Coletores (2 mL): Tubo polipropileno.

R9. Tubos Coletores (1,5 mL): Tubo polipropileno.

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no quadro anterior.
- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1 - Etanol 96-100%
- 2 - PBS 1X pode ser requerido por algumas amostras
- 3 - Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL)
- 4 - Microcentrífuga
- 5 - Agitador Vórtex
- 6 - Bloco de aquecimento ou banho maria
- 7 - Equipamento de Proteção Individual (luvas, jaleco, óculos)

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

O kit pode ser transportado em temperaturas entre 15 e 30°C. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

A temperatura de armazenamento é entre 15 e 30°C.

Após ressuspendido é recomendado armazenar o reagente Carrier RNA (R5) a -20°C.

Após o primeiro uso, é recomendado armazenar o reagente Proteinase K (R6) a -20°C.

CUIDADOS ESPECIAIS

1- Somente para uso profissional.

2- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos.

3- Manusear e descartar todas as amostras biológicas, reagentes e materiais utilizados para realização do ensaio como se fossem capazes de transmitir agentes infecciosos. Evitar o contato direto com as amostras biológicas e os reagentes. Evitar derrames ou aerossol. Os resíduos devem ser manuseados e descartados de acordo com as medidas de segurança adequadas.

4- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de ácidos nucleicos, transcrição reversa, amplificação e detecção, requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de ácidos nucleicos contidos nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.

5- É necessário dispor de áreas separadas para a extração/preparação de reações e para a amplificação/detecção de produtos. Nunca introduzir um produto de amplificação na área destinada para a extração ou preparação de produtos de amplificação.

6- Evitar o congelamento e descongelamento repetido dos reagentes e amostras.

7- Não usar o kit após a data de validade.

8- Recomendamos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente.

9- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.bioclin.com.br ou através de solicitação pelo SAC (Serviço de Assessoria ao Cliente) da Quibasa.

10- Não utilizar o produto em caso de danos na embalagem.

11- É imprescindível que os instrumentos e equipamentos utilizados estejam devidamente calibrados e submetidos às manutenções periódicas.

AMOSTRAS

Kit para extração de DNA/RNA viral de amostras de soro, plasma ou outros fluidos biológicos. As amostras devem ser coletadas e armazenadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares.

PROCEDIMENTO

Atenção:

Os reagentes Tampão de Lise (**R1**), e Lavagem 1 (**R2**) contém sal de guanidina, e devem ser manipulados utilizando EPIs adequados (jalecos, luvas e óculos). Estes reagentes não devem ser descartados em solução ácida ou de hipoclorito de sódio devido a formação de componentes reativos.

A. Preparo das Soluções de Trabalho

Ressuspender os reagentes **R3** e **R5** conforme mostrado na tabela abaixo:

Reagente	Volume de Ressuspensão
R3 - Lavagem 2 (concentrado)	Adicionar 48 mL de etanol 96-100%
R5 - Carrier RNA*	Adicionar 300µL de Água Livre de RNase (R4)

Antes de iniciar a extração:

- 1- Observar se os reagentes Lavagem 2 (**R3**) e o Carrier RNA (**R5**) estão preparados.
- 2- Configurar o bloco de aquecimento ou banho maria a 56°C.
- 3- Preaquecer o reagente Água livre de RNase (**R4**) a 70°C.

B. Extração do DNA/RNA

O produto é capaz de purificar amostras com volume de 200µL ou 400µL. A seguir, os protocolos para cada volume de amostra.

B.1 Protocolo para 200µL de volume de amostra

1. Lise das Amostras

- 1.1 Pipetar 200µL de amostra (soro, plasma ou outros fluidos biológicos) à temperatura ambiente, em Tubo Coletor de 1,5 mL (**R9**).
- 1.2 Adicionar 5µL de Proteinase K (**R6**)* ao Tubo Coletor de 1,5 mL contendo a amostra e homogeneizar.
- 1.3 Em seguida, pipetar 200µL de Tampão de Lise (**R1**) e homogeneizar vigorosamente (10-15 segundos).
- 1.4 Adicionar 5,6 µL de Carrier RNA (**R5**) preparado e homogeneizar.

* Após o uso, armazenar a - 20° C.

- 1.5 Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).
- 1.6 Adicionar 200µL de etanol (96-100%) a cada Tubo Coletor de 1,5 mL contendo amostra e homogeneizar por vórtex (10-15 segundos).
- 1.7 Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

2. Ligação

- 2.1 Identificar a Coluna **(R7)** dentro do Tubo Coletor de acordo com a amostra que está sendo purificada.
- 2.2 Transferir o volume total da amostra (~610µL) para respectiva Coluna e em seguida centrifugar por 3 minutos a 4.000 x g. Se a Coluna não estiver completamente seca, deve-se centrifugar novamente (aprox. 15.000 x g).
- 2.3 Após a centrifugação, transferir a Coluna para novo Tubo Coletor **(R8)** e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.

3. Lavagem

- 3.1 Adicionar 400µL do reagente Lavagem 1 **(R2)** a cada Coluna contendo amostra.
- 3.2 Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.
- 3.3 Transferir a Coluna para o novo Tubo Coletor **(R8)** e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 3.4 Adicionar 400µL do reagente Lavagem 2 **(R3)** preparado.
- 3.5 Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.
- 3.6 Transferir a Coluna para o novo Tubo Coletor **(R8)** e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 3.7 Adicionar 200µL do reagente Lavagem 2 **(R3)** a Coluna.
- 3.8 Centrifugar por 5 minutos a ≥ 15.000 x g, e prosseguir para a etapa 4. Eluição.

4. Eluição

- 4.1 Transferir a Coluna para um Tubo Coletor de 1,5 mL **(R9)**, e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 4.2 Incubar a Coluna/Tubo por 5 minutos a 56°C com a tampa aberta.
- 4.3 Adicionar 30~60µL de Água livre de RNase **(R4)** preaquecido a 70°C. Dispensar diretamente no centro da membrana.
- 4.4 Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 4.5 Centrifugar por 3 minutos a ≥ 15.000 x g, e descartar a Coluna.

4.6 Armazenar o DNA/RNA eluído a -20°C, caso não seja utilizado imediatamente. Para longos períodos de armazenamento é recomendado estocar o DNA/RNA à -70°C.

B.2 Protocolo para 400µL de volume de amostra

1. Lise das Amostras

1.1 Pipetar 400µL de amostra (soro, plasma ou outros fluidos biológicas) à temperatura ambiente, em Tubo Coletor de 1,5 mL (**R9**).

1.2 Adicionar 10µL de Proteinase K (**R6**)* ao Tubo Coletor de 1,5 mL contendo a amostra e homogeneizar.

1.3 Em seguida, pipetar 400µL de Tampão de Lise (**R1**) e homogeneizar vigorosamente (10-15 segundos).

1.4 Adicionar 11,2µL de Carrier RNA (**R5**)* preparado e homogeneizar.

1.5 Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

1.6 Adicionar 400µL de etanol (96-100%) a cada Tubo Coletor de 1,5 mL contendo amostra e homogeneizar por vórtex (10-15 segundos).

1.7 Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

2. Ligação

2.1 Identificar a Coluna (**R7**) dentro do Tubo Coletor de acordo com a amostra que está sendo purificada.

2.2 Transferir o volume total da amostra (~610µL) para respectiva Coluna e em seguida centrifugar por 3 minutos a 4.000 x g.

2.3 Descartar o filtrado e recolocar o Tubo Coletor na Coluna.

2.4 Transferir o restante do lisado para a Coluna e centrifugar novamente por 3 minutos a 4.000 x g. Se a Coluna não estiver completamente seca, deve-se centrifugar novamente (aprox. 15.000 x g por 1 minuto).

2.5 Após a centrifugação, transferir a Coluna para um novo Tubo Coletor (**R8**) e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.

3. Lavagem

3.1 Adicionar 400µL do reagente Lavagem 1 (**R2**) a cada Coluna contendo amostra.

3.2 Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.

* Após o uso, armazenar a - 20° C.

- 3.3 Transferir a Coluna para novo Tubo Coletor **(R8)** e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 3.4 Adicionar 400µL do reagente Lavagem 2 **(R3)** preparado.
- 3.5 Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.
- 3.6 Transferir a Coluna para novo Tubo Coletor **(R8)** e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 3.7 Adicionar 200µL do reagente Lavagem 2 **(R3)** a Coluna.
- 3.8 Centrifugar por 5 minutos a $\geq 15.000 \times g$, e prosseguir para a etapa 4. Eluição.

4. Eluição

- 4.1 Transferir a Coluna para um Tubo Coletor de 1,5 mL **(R9)**, e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 4.2 Incubar a Coluna/Tubo por 5 minutos a 56°C com a tampa aberta.
- 4.3 Adicionar 30~60µL de Água livre de RNase **(R4)** preaquecido a 70°C. Dispensar diretamente no centro da membrana.
- 4.4 Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 4.5 Centrifugar por 3 minutos a $\geq 15.000 \times g$, e descartar a Coluna.
- 4.6 Armazenar o DNA/RNA eluído a -20°C, caso não seja utilizado imediatamente. Para longos períodos de armazenamento é recomendado estocar o DNA/RNA à -70°C.

Limitações do Processo

Contaminações cruzadas que ocorrem durante a coleta da amostra, processamento, transporte e armazenamento poderão ocasionar em degradação da mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ogura T, Tsuchiya A, Minas T, Mizuno S. Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct. BMC Res Notes. 2015; 8:644.

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do kit na ANVISA: 10269360296

SIMBOLOGIA UNIVERSAL



NÚMERO DE CATÁLOGO



NÚMERO DO LOTE



DATA DE FABRICAÇÃO



DATA DE VALIDADE
(último dia do mês)



LIMITE DE TEMPERATURA
(conservar a)



O CONTEÚDO É SUFICIENTE
PARA <N> TESTES



CONSULTAR INSTRUÇÕES
DE USO



PRODUTO PARA
DIAGNOSTICO IN VITRO



CUIDADO



FABRICADO POR



CONTROLE



CONTROLE POSITIVO



CONTROLE NEGATIVO



RISCO BIOLÓGICO



INFLÁMVEL



CORROSIVO



TÓXICO



PERIGO



Extração de DNA/RNA Viral

Español . Instrucciones de uso

REF K204

Revisión: Junio/2017

INDICE

Finalidad	3
Principio de Acción	3
Presentación	3
Reactivos	4
Equipamientos e Insumos Operacionales	4
Condiciones de Almacenamiento y Transporte	4
Cuidados Especiales	4
Muestras	5
Procedimiento	5
A . Preparación de Soluciones de Trabajo	6
B . Extracción de DNA/RNA.....	6
B.1 Protocolo para el volumen de 200 µL de la muestra	6
1. La lisis de muestras	6
2. Conexión	7
3. Lavado	7
4. Elución	7
B.2 Protocolo para el volumen de 400µL de la muestra	7
1. La lisis de muestras	7
2. Conexión	8
3. Lavado	8
4. Elución	9
Limitaciones del Proceso	9
Referencias Bibliográficas	9
Asistencia al Consumidor	9
Simbología Universal	10

FINALIDAD

Producto desarrollado para la extracción y purificación de DNA / RNA viral de suero, plasma y otros fluidos biológicos.

Los ácidos nucleicos obtenidos pueden ser utilizados para diversas aplicaciones como PCR, RT-PCR, la hibridación, secuenciación, etc.

PRINCIPIO DE ACCIÓN

El kit **Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral** es un producto desarrollado para el aislamiento y purificación de DNA / RNA viral a partir de muestras biológicas.

El método utilizado es la extracción de la membrana de sílice. El proceso se lleva a cabo en cuatro etapas: 1) Lisis Celular: la disrupción celular para liberar los ácidos nucleicos; 2) Conexión: la unión selectiva de ácido nucleico a la sílice membrana; 3) Lavado: para eliminar las impurezas residuales; 4) Elución: liberar el ácido nucleico a partir de la membrana de sílice. Al final del proceso nos hemos concentrado de ácido nucleico con alta pureza.

Reactivo	Presentación 50 preparativos
R1	25 mL
R2	30 mL
R3	12 mL
R4	13 mL
R5	2 x 300 µg
R6	600 µL
R7	50 unid.
R8	150 unid.
R9	100 unid.

REACTIVOS

R1. Tampón de Lisis: Hidrocloruro de guanidina.

R2. Lavado 1: Hidrocloruro de guanidina, TRIS-HCl.

R3. Lavado 2: TRIS-HCl, SDS.

R4. Agua Libre de RNasa.

R5. Carrier RNA: Poliadenilico ácido.

R6. Proteinasa K: Enzima proteinasa K.

R7. Columnas: Tubo de polipropileno con una membrana de sílice.

R8. Tubos de Recogida (2 mL): Tubos de polipropileno.

R9. Tubos de Recogida (1,5 mL): Tubos de polipropileno.

EQUIPAMIENTOS E INSUMOS OPERCIONALES

Materiales contenidos en el kit:

- Reactivos descritos en la cuadro anterior.
- Instrucciones de uso (manual).

Materiales necesarios, pero no contenidos en el kit:

- 1- Etanol de 96-100%
- 2- PBS 1X puede ser necesario para algunas muestras
- 3- Micropipetas y punteras esterilizadas con filtro (0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L).
- 4- Microcentrífuga
- 5- Vórtex
- 6- Bloque de calefacción o baño de agua
- 7- Equipo de protección personal (guantes, bata de laboratorio, gafas)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

El transporte puede realizarse a temperaturas entre 15 y 30°C. Mantener al abrigo de la luz y evitar humedad.

La temperatura de almacenamiento es de entre 15 y 30°C.

Después de resuspensión, se recomienda almacenar el Carrier RNA (R5) a -20°C.

Después del primer uso, se recomienda almacenar el reactivo Proteinasa K (R6) a -20°C.

CUIDADOS ESPECIALES

1- Solamente para el uso profesional.

2- Seguir con rigor la metodología propuesta para la obtención de resultados exactos.

3- Manipular y desechar todas las muestras biológicas, reactivos y materiales utilizados para la realización del ensayo como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Evitar contacto directo con las muestras biológicas y los reactivos. Evitar derrames o aerosol. Los residuos deben ser manipulados y desechados de acuerdo con las medidas de seguridad adecuadas.

4- Procedimientos de biología molecular, tales como la extracción de ácidos nucleicos, transcripción inversa, amplificación y detección requieren personal calificado para evitar el riesgo de resultados errados, especialmente debido a la degradación de ácidos nucleicos contenidos en las muestras o contaminación de la muestra por productos de amplificación.

5- Es necesario disponer de áreas separadas para la extracción/preparación de reacciones y para la ampliación/detección de productos. Nunca introducir un producto de amplificación en la área destinada para la extracción o preparación de productos de amplificación.

6- Evitar el congelamiento y descongelamiento repetido de los reactivos y muestras.

7- No usar el kit después de la fecha de vencimiento.

8- Se recomienda la aplicación de la ley local, estatal y federal de protección ambiental para la eliminación de reactivos y materiales biológicos se hace de acuerdo con la legislación vigente.

9- Para obtener información relacionada con la seguridad biológica o en caso de accidentes con el producto, consultar la FISPQ (Ficha de Informaciones de la Seguridad de Productos Químicos) disponibles en el site www.bioclin.com.br o solicitando a través del SAC (Servicio de Asesoría al Cliente) de Quibasa.

10- No utilice el producto en caso de daños en su embalaje.

11- Es esencial que los instrumentos y equipos estén adecuadamente calibrados y sometidos a mantenimiento periódicos.

MUESTRAS

Kit para la extracción de DNA/RNA viral en suero, plasma y otros fluidos biológicos. Las muestras deben ser recogidos y almacenados de acuerdo con las recomendaciones del laboratorio para el análisis molecular.

PROCEDIMIENTO

Atención:

Reactivos Tampón de Lisis (**R1**), y Lavado 1 (**R2**) contiene sal de guanidina, y deben ser manejados usando el EPIs apropiado (batas, guantes y gafas). Estos reactivos no deben ser desechados en solución de hipoclorito de sodio o ácido debido a la formación de los componentes reactivos.

A. Preparación de Soluciones de Trabajo

Resuspender **R3** y **R5** reactivos como se muestra en la siguiente tabla:

Reactivos	Volume de Ressuspensão
R3 - Lavado 2 (concentrado)	Adicionar 48 mL de etanol 96-100%
R5 - Carrier RNA*	Adicionar 300µL de Agua Libre de RNasa (R4)

Antes de comenzar la extracción:

- 1- Tenga en cuenta que los reactivos de Lavado 2 (**R3**) y Carrier RNA (**R5**) se preparan.
- 2- Configurar el bloque de calefacción o baño de agua a 56°C.
- 3- Precalentar lo reactivo Agua Libre de RNasa (**R4**) a 70°C.

B. Extracción de DNA/RNA

El producto es capaz de purificar muestras con un volumen de 200µL o 400µL. Los siguientes son los protocolos para cada volumen de muestra.

B.1 Protocolo para el volumen de 200µL de la muestra

1. La lisis de muestras

- 1.1 Pipetear 200µL de muestra (suero, plasma y otros fluidos biológicos) a temperatura ambiente, en Tubo de Recogida de 1,5 mL (**R9**)
- 1.2 Adicionar 5µL de Proteinasa K (**R6**)* a la Tubo de Recogida de 1,5 mL que contiene la muestra y mezclar.
- 1.3 Pipetear 200µL de Tampón de Lisis (**R1**) y agitar vigorosamente (10-15 segundos).
- 1.4 Adicionar 5,6µL de Carrier RNA (**R5**) preparado y mezclar.

* Después del uso, almacenar a - 20° C.

- 1.5 Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).
- 1.6 Adicionar 200µL de etanol (96-100%) a cada Tubo de Recogida de 1,5 mL que contiene la muestra y mezclar en vórtex (10-15 segundos).
- 1.7 Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

2. Conexión

- 2.1 Identificar la Columna **(R7)** en el Tubo de Recogida de acuerdo con la muestra que está siendo purificada.
- 2.2 Transferir el volumen total de la muestra (~610µL) para la Columna respectiva y luego se centrifuga durante 3 minutos a 4.000 x g. Si la Columna no está completamente seca, se debe centrifugó de nuevo (aprox. 15.000 x g).
- 2.3 Después de la centrifugación, transferir la Columna para nuevo Tubo de Recogida **(R8)** y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.

3. Lavado

- 3.1 Adicionar 400µL del reactivo Lavagem 1 **(R2)** en cada Columna que contiene la muestra.
 - 3.2 Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
 - 3.3 Transferir la Columna para nuevo Tubo de Recogida **(R8)** y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.
 - 3.4 Adicionar 400µL del reactivo de Lavado 2 **(R3)** preparado.
 - 3.5 Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.
 - 3.6 Transferir la Columna para nuevo Tubo de Recogida **(R8)** y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.
 - 3.7 Adicionar 200µL de reactivo de Lavado 2 **(R3)** en cada Columna.
 - 3.8 Centrifugar durante 5 minutos a ≥ 15.000 x g, y continúe en el paso 4.
- Elución.

4. Elución

- 4.1 Transferir la Columna a un Tubo de Recogida de 1,5 mL **(R9)** y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.
- 4.2 Incubar la Columna / Tubo durante 5 minutos a 56°C con la tapa abierta.
- 4.3 Adicionar 30~60µL de Agua Libre de RNasa **(R4)** precalentado a 70°C. Dispensar directamente en el centro de la membrana.
- 4.4 Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- 4.5 Centrifugar durante 3 minutos a ≥ 15.000 x g, y descartar la Columna.
- 4.6 Almacenamiento del DNA/RNA se eluyó a -20°C si no se utiliza inmediatamente. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda guardar el DNA/RNA -70°C.

B.2 Protocolo para el volumen de 400µL de la muestra

1. La lisis de muestras

1.1 Pipetear 400µL de muestra (suero, plasma y otros fluidos biológicos) a temperatura ambiente, en Tubo de Recogida de 1,5 mL (**R9**).

1.2 Adicionar 10µL de Proteinasa K (**R6**)* a la Tubo de Recogida de 1,5 mL que contiene la muestra y mezclar.

1.3 Pipetear 400µL de Tampón de Lisis (**R1**) y agitar vigorosamente (10-15 segundos).

1.4 Adicionar 11,2µL de Carrier RNA (**R5**)* preparado y mezclar.

1.5 Incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

1.6 Adicionar 400µL de etanol (96-100%) a cada Tubo de Recogida de 1,5 mL de muestra que contiene y mezclar bien por agitación (10-15 segundos).

1.7 Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

2. Conexión

2.1 Identificar la Columna (**R7**) en el Tubo de Recogida de acuerdo con la muestra que está siendo purificada.

2.2 Transferir el volumen total de la muestra (~610µL) para la Columna respectiva y luego se centrifuga durante 3 minutos a 4.000 x g.

2.3 Desechar el filtro y vuelva a colocar la Columna del Tubo de Recogida.

2.4 Transferencia el resto del lisado a la Columna y centrifugar de nuevo durante 3 minutos a 4.000 x g. Si la Columna no está completamente seca, se debe centrifugó de nuevo (aprox. 15.000 x g durante 1 minuto).

2.5 Después de la centrifugación, transferir la Columna para nuevo Tubo de Recogida (**R8**) y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.

3. Lavado

3.1 Adicionar 400µL del reactivo Lavagem 1 (**R2**) en cada Columna que contiene la muestra.

3.2 Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

3.3 Transferir la Columna para nuevo Tubo de Recogida (**R8**) y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.

3.4 Adicionar 400µL del reactivo de Lavado 2 (**R3**) preparado.

3.5 Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

3.6 Transferir la Columna para nuevo Tubo de Recogida (**R8**) y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.

* Después del uso, almacenar a - 20° C.

3.7 Adicionar 200µL de reactivo de Lavado 2 (**R3**) en cada Columna.

3.8 Centrifugar durante 5 minutos a $\geq 15.000 \times g$, y continúe en el paso 4. Elución.

4. Elución

4.1 Transferir la Columna a un Tubo de Recogida de 1,5 mL (**R9**) y desechar el Tubo de Recogida con el filtrado.

4.2 Incubar la Columna / Tubo durante 5 minutos a 56°C con la tapa abierta.

4.3 Adicionar 30~60µLw de Agua Libre de RNasa (**R4**) precalentado a 70°C. Dispensar directamente en el centro de la membrana.

4.4 Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

4.5 Centrifugar durante 3 minutos a $\geq 15.000 \times g$, y descartar la Columna.

4.6 Almacenamiento del DNA/RNA se eluyó a -20°C si no se utiliza inmediatamente. Para el almacenamiento a largo plazo, se recomienda guardar el DNA/RNA -70°C.

LIMITACIONES DEL PROCESO

Contaminaciones cruzadas que ocurren durante la colecta de la muestra, procesamiento, transporte y almacenamiento podrán ocasionar resultados falsos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Ogura T, Tsuchiya A, Minas T, Mizuno S. Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct. BMC Res Notes. 2015; 8:644.

ASISTENCIA AL CONSUMIDOR

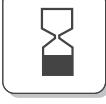
Servicio de Asesoría al Cliente

Tel.: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro del kit en la ANVISA: 10269360296

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	NÚMERO DEL CATÁLOGO		ELABORADO POR
	NÚMERO DE LOTE		CONTROL
	FECHA DE FABRICACIÓN		CONTROL POSITIVO
	ESTABLE HASTA (último día del mês)		CONTROL NEGATIVO
	TEMPERATURA LIMITE (conservar a)		RIESGO BIOLÓGICO
	CONTENIDO SUFICIENTE PARA <N> TESTES		INFLAMABLE
	CONSULTAR INSTRUCCIONES DE USO		CORROSIVO
	DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	PRECAUCIÓN		PELIGRO



Extração de DNA/RNA Viral

English . Usage instructions

REF K204

Review: June/2017

INDEX

Function	3
Principle of Action	3
Presentation	3
Reagents	4
Equipaments and Operational Inputs	4
Transportation and Storage Conditions.....	4
Special Care	5
Samples	5
Procedure	6
A . Preparation of Working Solutions	6
B . DNA/RNA Extraction	6
B.1 Protocol for sample volume of 200µL	6
1. Samples Lysis	6
2. Binding.....	7
3. Washing	7
4. Elution	7
B.2 Protocol for sample volume of 400µL	8
1. Samples Lysis	8
2. Binding	8
3. Whasing	8
4. Elution	9
Process Limitations	9
Bibliographic References	9
Customer Service	9
Universal Symbology	10

FUNCTION

Product developed for Viral DNA /RNA extraction and purification in serum, plasma and other biological fluids.

The nucleic acids obtained can be used for different applications like PCR, RT-PCR, Hibridization, Sequencing, etc.

PRINCIPLE OF ACTION

The **Bio Gene Extração de DNA/RNA Viral** kit is a product developed for extraction and purification of Viral DNA / RNA in biological samples.

The method used is the extraction by silica membrane. The process is carried out in 4 steps: 1) Cell Lysis: cell disruption for the release of nucleic acids; 2) Binding: selective binding of nucleic acid to silica membrane; 3) Washing: to remove residual impurities; 4) Elution: release the nucleic acid from silica membrane. At the end of the process we have concentrated nucleic acid with high purity.

Reagent	Presentation 50 Preps
R1	25 mL
R2	30 mL
R3	12 mL
R4	13 mL
R5	2 x 300 µg
R6	600 µL
R7	50 unid.
R8	150 unid.
R9	100 unid.

REAGENTS

- R1. Lysis Buffer:** Guanidine hydrochloride.
R2. Wash 1: Guanidine hydrochloride, TRIS-HCl.
R3. Wash 2: TRIS-HCl, SDS.
R4. RNase Free Water.
R5. Carrier RNA: Acid polyadenylic.
R6. Proteinase K: Enzyme proteinase K.
R7. Columns: Polypropylene tube with a silica membrane.
R8. Collectors Tubes (2 mL): Polypropylene tube.
R9. Collectors Tubes (1.5 mL): Polypropylene tube.

EQUIPMENT AND OPERATING INPUTS

Materials contained in the kit:

- Reagents described in the table above.
- Usage instructions (manual).

Materials required, but not included in the kit:

- 1- 96-100% ethanol
- 2- PBS 1X may be required for some samples
- 3- Micropipettes and sterile filter pipette tips (0.5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L).
- 4- Microcentrifuge
- 5- Vortex
- 6- Heating block or water bath
- 7- Personal protective equipment (gloves, lab coat, glasses)

TRANSPORTATION AND STORAGE CONDITIONS

The kit may be transported between 15 and 30°C. Protect from light and avoid moisture.

The storage temperature is between 15 and 30°C.

After resuspended is recommended to store the Carrier RNA reagent (R5) at -20°C. After first use, is recommended to store the Proteinase K reagent (R6) -20°C.

SPECIAL CARE

1- For professional use only.

2- Strictly follow the methodology proposed to obtain accurate results.

3- Handle and dispose of all biological samples, reagents and materials as it contain infectious agents. Avoid direct contact with biological samples and reagents. Avoid spills and aerosol. Handle and dispose the waste in accordance with appropriate security procedures.

4- It is required skilled personnel for the molecular biology procedures in order to minimize the risk of erroneous results, degradation of nucleic acids contained in the samples or even sample contamination by amplicons.

5- It is necessary to have separate areas for the extraction / preparation of reactions and for the amplification / detection of products. Never introduce an amplification product in the area intended for the extraction or preparation of amplification products.

6- Avoid repeated thawing and freezing of the reagents.

7- Do not use reagents after expiration date.

8- We recommend applying the local, state and federal rules for environmental protection, so that disposal of reagents and biological material can be made in accordance with current legislation.

9- To obtain information related to biosafety or in case of accidents with the product, consult the MSDS (Material Safety Data Sheet) available on the website www.bioclin.com.br or upon request by the SAC (Customer Advisory Service) of Quibasa.

10- Do not use the product in case of damaged packaging.

11- It is essential that the instruments and equipment used are properly calibrated and subjected to periodic maintenance.

SAMPLES

Kit for Viral DNA / RNA extraction from serum, plasma or other biological fluids. Samples must be collected and stored according to the laboratory's recommendations for molecular testing.

PROCEDURE

Attention:

The Lysis Buffer (**R1**) and Wash 1 (**R2**) reagents contains guanidine salt, and must be handled using suitable PPEs (coats, gloves and goggles). These reagents must not be disposed of on acid solution or on sodium hypochlorite due to the formation of reactive components.

A. Preparation of Working Solutions

Resuspend **R3** and **R5** reagents as shown in the table below:

Reagent	Resuspension Volume
R3 - Wash 2 (concentrated)	Add 48 mL of ethanol 96-100%
R5 - Carrier RNA*	Add 300µL of RNase Free Water (R4)

Before starting the extraction:

- 1- Note if the reagents Wash 2 (**R3**) and Carrier RNA (**R5**) are prepared.
- 2- Set the heating block or water bath at 56°C.
- 3- Preheat reagent RNase free water (**R4**) at 70°C.

B. DNA/RNA extraction

The product is able to purify samples with a volume of 200µL or 400µL. The following protocols are specific for each sample volume.

B.1 Protocol for sample volume of 200µL

1. Samples Lysis

- 1.1 Pipette 200µL of sample (serum, plasma or other biological fluids) at room temperature in Collector Tube 1.5 mL (**R9**).
- 1.2 Add 5µL of Proteinase K (**R6**)* to the Collector Tube 1.5 mL with sample and mix.
- 1.3 Then, pipette 200µL of Lysis Buffer (**R1**) and shake vigorously (10-15 seconds).
- 1.4 Add 5.6 µL of Carrier RNA (**R5**) prepared and mix.
- 1.5 Incubate for 3 minutes at room temperature (18-25°C).

* After use, store at - 20° C.

1.6 Add 200µL of ethanol (96-100%) to each Collector Tube 1.5 mL with sample and mix by vortexing (10-15 seconds).

1.7 Incubate for 5 minutes at room temperature (18-25°C).

2. Binding

2.1 Identify the Column **(R7)** into Collector Tube according to the sample which is being purified.

2.2 Transfer the total of lysed sample volume (~ 610µL) into the respective Column and then centrifuge for 3 minutes at 4,000 x g. If the Column is not completely dried, it must be centrifuged again (approx. 15,000 x g).

2.3 After centrifugation, transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

3. Washing

3.1 Add 400µL of Wash 1 **(R2)** to each Column containing sample.

3.2 Centrifuge for 1 minute at 11,000 x g.

3.3 Transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

3.4 Add 400µL of Wash 2 **(R3)** prepared.

3.5 Centrifuge for 1 minute at 11,000 x g.

3.6 Transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

3.7 Add 200µL of Wash 2 **(R3)** to Column.

3.8 Centrifuge for 5 minutes at $\geq 15,000$ x g, and proceed to step 4. Elution.

4. Elution

4.1 Transfer the Column to a Collector Tube 1.5 mL **(R9)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

4.2 Incubate the Column / Tube for 5 minutes at 56°C with the lids opened.

4.3 Add 30~60µL of RNase Free Water **(R4)** preheated to 70°C. Dispense directly in the center of the membrane.

4.4 Incubate at room temperature for 3 minutes.

- 4.5 Centrifuge for 3 minutes at $\geq 15,000 \times g$, and discard the Column.
- 4.6 Storing the DNA / RNA eluted at -20°C if not used immediately. For long time storage, it is recommended to stock DNA/RNA at -70°C

B.2 Protocol for sample volume of 400 μL

1. Samples Lysis

- 1.1 Pipette 400 μL of sample (serum, plasma or other biological fluids) at room temperature in Collector Tube 1.5 mL (**R9**).
- 1.2 Add 10 μL of Proteinase K (**R6**)* to the Collector Tube 1.5 mL with sample and mix.
- 1.3 Then, pipette 400 μL of Lysis Buffer (**R1**) and stir vigorously (10-15 seconds).
- 1.4 Add 11.2 μL of Carrier RNA (**R5**)* prepared and mix.
- 1.5 Incubate for 3 minutes at room temperature ($18-25^{\circ}\text{C}$).
- 1.6 Add 400 μL of ethanol (96-100%) to each well with sample and mix by vortexing (10-15 seconds).
- 1.7 Incubate for 5 minutes at room temperature ($18-25^{\circ}\text{C}$).

2. Binding

- 2.1 Identify the Column (**R7**) into Collector Tube according to the sample which is being purified.
- 2.2 Transfer the total of lysed sample volume ($\sim 610\mu\text{L}$) into the respective Column and then centrifuge for 3 minutes at $4,000 \times g$.
- 2.3 Discard the filter and replace the Collector Tube in the Column.
- 2.4 Transfer the remaining lysate to the Column and centrifuge again for 3 minutes at $4,000 \times g$. If the Column is not completely dried, it must be centrifuged again (approx. $15,000 \times g$ for 1 minute).
- 2.5 After centrifugation, transfer the Column to new Collector Tube (**R8**) and discard the Collector Tube with the filtrate.

3. Washing

- 3.1 Add 400 μL of Wash 1 (**R2**) to each Column containing sample.
- 3.2 Centrifuge for 1 minute at $11,000 \times g$.

* After use, store at -20°C .

3.3 Transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

3.4 Add 400µL of Wash 2 **(R3)** prepared.

3.5 Centrifuge for 1 minute at 11,000 x g.

3.6 Transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

3.7 Add 200µL of Wash 2 **(R3)** to Column.

3.8 Centrifuge for 5 minutes at $\geq 15,000 \times g$, and proceed to step 4. Elution.

4. Elution

4.1 Transfer the Column to a Collector Tube 1.5 mL **(R9)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

4.2 Incubate the Column / Tube for 5 minutes at 56°C with the lid opened.

4.3 Add 30~60µL of RNase Free Water **(R4)** preheated to 70°C. Dispense directly in the center of the membrane.

4.4 Incubate at room temperature for 3 minutes.

4.5 Centrifuge for 3 minutes at $\geq 15,000 \times g$, and discard the Column.

4.6 Storing the DNA / RNA eluted at -20°C if not used immediately. For long time storage, it is recommended to stock DNA/RNA at -70°C

PROCESS LIMITATIONS

Cross contamination that eventually occurs during the sample collection, processing, transportation and storage may give false results.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1- Ogura T, Tsuchiya A, Minas T, Mizuno S. Methods of high integrity RNA extraction from cell/agarose construct. BMC Res Notes. 2015; 8:644.

CUSTOMER SERVICE

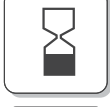
Customer Advisory Service

Phone: 0800 031 5454

E-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA registration for kit: 10269360296

SIMBOLOGIA UNIVERSAL

	CATALOG NUMBER		MANUFACTURED BY
	BATCH CODE		CONTROL
	DATE OF MANUFACTURE		POSITIVE CONTROL
	USED BY (last day of month)		NEGATIVE CONTROL
	TEMPERATURE LIMITATION (store at)		BIOLOGICAL RISK
	CONTAINS SUFFICIENT FOR <N> TESTS		INFLAMMABLE
	CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE		CORROSIVE
	IN VITRO DIAGNOSTIC DEVICE		POISON
	CAUTION		DAINGER

BIO GENE

Bioclin ·· QUIBASA

 Rua Teles de Menezes, 92 - Belo Horizonte - MG - Brasil - CEP: 31565-130
Tel +55 31 3439 5454 - Fax +55 31 3439 5455 - www.bioclin.com.br
FARM. RESP. Silvio Wandalsen Arndt - CRF MG 7422
C.N.P.J.: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira