



Extração de DNA/RNA Viral

Instruções de uso
Instrucciones de uso
Usage instructions

ÍNDICE

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

FINALIDADE

Produto desenvolvido para a extração e purificação de DNA/RNA viral de amostras de escarro, líquido cefalorraquidiano, plasma, sangue total, sêmen, soro, swab, tecido e urina.

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	250 Preparações
R1	1 x 11 mL	1 x 55 mL
R2	1 x 22 mL	1 x 110 mL
R3	1 x 7 mL	1 x 33 mL
R4	1 x 13 mL	1 x 30 mL
R5	1 x 300 µg	4 x 400 µg
R6	1 x 300 µL	1 x 1,5 mL
R7	1 x 50 unid	1 x 250 unid
R8	3 x 50 unid	3 x 250 unid
R9	2 x 50 unid	2 x 250 unid

REAGENTES

R1. Tampão de Lise: Hidrocloreto de Guanidina.

R2. Lavagem 1: Hidrocloreto de Guanidina, álcool.

R3. Lavagem 2: Solução tampão.

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 - Microcentrifuga
- 5 - Agitador Vórtex
- 6 - Bloco de aquecimento
- 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 ressuscitado 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 a 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 escarro, líquido cefalorraquidiano, plasma, sangue total, sêmen, soro, swab, tecido e urina. 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	Apresentação	
	50 Preparações	250 Preparações
R3 - Lavagem 2 (concentrado)	Adicionar 28 mL de Etanol 96-100%	Adicionar 132 mL de Etanol 96-100%
R5 - Carrier RNA*	Adicionar 300µL de Água Livre de RNase (R4)	Adicionar 400µL 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 a 56°C.
- 3- Preaquecer o volume do reagente Água livre de RNase (**R4**) a 70°C para eluição.

B. Extração do DNA/RNA**1. Lise das Amostras****A. Plasma, Soro, Líquido Cefalorraquidiano e Urina**

- 1.1 Pipetar 200µL de amostra 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 Continuar no passo **2. Precipitação**.

B. Sangue total

- 1.1 Pipetar 200µL de amostra 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 Incubar por 5 minutos a 56°C.
- 1.5 Continuar no passo **2. Precipitação**.

C. Swab em meio de transporte / estabilizante

- 1.1 Pressionar o swab com a ponteira no meio de transporte para retirar o material biológico (pode ser centrifugado em um breve spin).
- 1.2 Descartar o swab e pipetar 200µL do meio de transporte contendo o material biológico em um Tubo Coletor de 1,5 mL (**R9**).
- 1.3 Adicionar 5µL de Proteinase K (**R6**)* ao Tubo Coletor de 1,5 mL contendo a amostra e homogeneizar.
- 1.4 Em seguida, pipetar 200µL de Tampão de Lise (**R1**) e homogeneizar vigorosamente (10-15 segundos).
- 1.5 Continuar no passo **2. Precipitação**.

* Após o uso, armazenar a -20°C.

D. Amostras viscosas (Sêmen e Escarro)

1.1 Pipetar 200µL de amostra à temperatura ambiente, em Tubo Coletor de 1,5 mL (**R9**).

Sugestão: Amostras muito viscosas devem ser diluídas na proporção de 1:2 em PBS 1X.

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 Continuar no passo 2. **Precipitação.**

E. Tecido

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- Gral e pistilo ou disruptor/ homogeneizador de tecidos
- Nitrogênio líquido
- Seringa plástica estéril acoplada a agulha de 0.7-0.9mm

Opcional: Agente redutor - β -Mercaptoetanol ou 10 - 20 mM Ditiotretol (DTT)

A extração de ácidos nucleicos principalmente de amostras de tecidos pode promover a liberação de grande quantidade de endonucleases (DNase e RNase) durante a etapa de lise. As endonucleases causam redução na produção e qualidade dos ácidos nucleicos principalmente das moléculas de RNA. Para a inativação das RNases pode-se utilizar um agente redutor (DTT ou β -Mercaptoetanol) preservando-se assim a integridade dos ácidos nucleicos.

A extração pode ser realizada sem a presença do agente redutor observando que as etapas de maceração e de lise devem ser realizadas de forma ágil evitando o aquecimento e/ou descongelamento das amostras de tecidos previamente armazenadas a -20°C ou a -80°C.

Protocolo

1.1 Pesar entre 20-30 mg de tecido fresco a ser extraído.

Obs: É recomendando armazenar os tecidos a serem extraídos de forma adequada (-20°C ou -80°C) para manter a integridade dos ácidos nucleicos. Evitar o congelamento e descongelamento das amostras. No caso da utilização de solução estabilizante comercial o armazenamento deve ser realizado de acordo com o manual do fabricante.

1.2 Realizar a maceração do tecido em gral e pistilo utilizando nitrogênio líquido.

Obs: A maceração ou ruptura do tecido também pode ser realizada por equipamentos desenvolvidos para este fim, de acordo com as recomendações do fabricante.

1.3 Transferir a amostra macerada para um microtubo de 1,5 mL (não fornecido).

1.4 Em seguida, pipetar 200µL de Tampão de Lise (**R1**) e homogeneizar vigorosamente por 1 minuto.

Opcional: Pode ser adicionado ao Tampão de Lise (**R1**) um agente redutor como β -Mercaptoetanol ou 10 - 20 mM Ditiotretol (DTT) na proporção de 1% do volume de lise, ou seja, 2µL de agente redutor para cada 200µL de Tampão de Lise (**R1**).

1.5 Homogeneizar o tecido lisado passando pelo menos 5 vezes por agulha (0.7 – 0.9 mm) acoplada a seringa plástica estéril.

Obs: A homogeneização também pode ser realizada por equipamentos desenvolvidos para este fim, de acordo com as recomendações do fabricante.

1.6 Centrifugar o tecido lisado a 15.000 x g por 3 minutos.

1.7 Transferir o sobrenadante para um novo Tubo Coletor de 1,5 mL (**R9**).

1.8 Continuar no passo 2. **Precipitação.**

* Após o uso, armazenar a -20°C.

2. Precipitação

- 2.1 Adicionar 5,6µL de Carrier RNA (**R5**)* preparado e homogeneizar.
- 2.2 Incubar por 3 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).
- 2.3 Adicionar 200µL de Etanol (96-100%) a cada Tubo Coletor de 1,5 mL contendo amostra e homogeneizar por vórtex (10-15 segundos).
- 2.4 Incubar por 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).

* Após o uso, armazenar a -20°C.

3. Ligação

- 3.1 Identificar a Coluna (**R7**) dentro do Tubo Coletor de acordo com a amostra que está sendo purificada.
- 3.2 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).
- 3.3 Após a centrifugação, transferir a Coluna para novo Tubo Coletor (**R8**) e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.

4. Lavagem

- 4.1 Adicionar 400µL do reagente Lavagem 1 (**R2**) a cada Coluna contendo amostra.
- 4.2 Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.
- 4.3 Transferir a Coluna para o novo Tubo Coletor (**R8**) e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 4.4 Adicionar 400µL do reagente Lavagem 2 (**R3**) preparado.
- 4.5 Centrifugar por 1 minuto a 11.000 x g.
- 4.6 Transferir a Coluna para o novo Tubo Coletor (**R8**) e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 4.7 Adicionar 200µL do reagente Lavagem 2 (**R3**) a Coluna.
- 4.8 Centrifugar por 5 minutos a ≥ 15.000 x g.

5. Eluição

- 5.1 Transferir a Coluna para um Tubo Coletor de 1,5 mL (**R9**), e descartar o Tubo Coletor com o filtrado.
- 5.2 Incubar a Coluna/Tubo por 5 minutos a 56°C com a tampa aberta.
- 5.3 Adicionar 30~60µL de Água livre de RNase (**R4**) preaquecido a 70°C. Dispensar diretamente no centro da membrana.
- 5.4 Incubar a temperatura ambiente por 3 minutos.
- 5.5 Centrifugar por 3 minutos a ≥ 15.000 x g, e descartar a Coluna.
- 5.6 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		FABRICADO POR
	NÚMERO DO LOTE		CONTROLE
	DATA DE FABRICAÇÃO		CONTROLE POSITIVO
	DATA DE VALIDADE (último dia do mês)		CONTROLE NEGATIVO
	LIMITE DE TEMPERATURA (conservar a)		RISCO BIOLÓGICO
	O CONTEÚDO É SUFICIENTE PARA <N> TESTES		INFLÁMVEL
	CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO		CORROSIVO
	PRODUTO PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO		TÓXICO
	CUIDADO		PERIGO



Extração de DNA/RNA Viral

Español . Instrucciones de uso

REF K204

Revisión: Abril/2020

INDICE

Finalidad	3
Principio de Acción	3
Presentación	3
Reactivos	3
Equipamientos e Insumos Operacionales	4
Condiciones de Almacenamiento y Transporte	4
Cuidados Especiales	4
Muestras	5
Procedimiento	5
A . Preparación de Soluciones de Trabajo	5
B . Extracción de DNA/RNA	6
1. La lisis de Muestras	6
2. Precipitación	8
3. Conexión	8
4. Lavado	8
5. 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 esputo, líquido cefalorraquídeo, plasma, sangre total, semen, suero, hisopo, tejido y orina.

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 Extracção 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	250 Preparativos
R1	1 x 11 mL	1 x 55 mL
R2	1 x 22 mL	1 x 110 mL
R3	1 x 7 mL	1 x 33 mL
R4	1 x 13 mL	1 x 30 mL
R5	1 x 300 µg	4 x 400 µg
R6	1 x 300 µL	1 x 1,5 mL
R7	1 x 50 unid	1 x 250 unid
R8	3 x 50 unid	3 x 250 unid
R9	2 x 50 unid	2 x 250 unid

REACTIVOS

R1. Tampón de Lisis: Hidrocloruro de Guanidina.

R2. Lavado 1: Hidrocloruro de Guanidina, alcohol.

R3. Lavado 2: Solución tampón.

R4. Agua Libre de RNasa.

R5. Carrier RNA: Poliadenilico Ácido.

R6. Proteínasa K: Enzima Proteínasa 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.
- 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 a 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 em 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 esputo, líquido cefalorraquídeo, plasma, sangre total, semen, suero, hisopo, tejido y orina. 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	Presentación	
	50 Preparativos	250 Preparativos
R3 - Lavado 2 (concentrado)	Adicionar 28 mL de Etanol 96-100%	Adicionar 132 mL de Etanol 96-100%
R5 - Carrier RNA*	Adicionar 300µL de Agua Libre de RNasa (R4)	Adicionar 400µL 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 a 56°C.
- 3- Precalentar el volumen del reactivo Agua Libre de RNasa (**R4**) a 70°C para la elución.

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

B. Extracción de DNA/RNA

1. La lisis de Muestras

A. Plasma, Suero, Líquido Cefalorraquídeo y Orina

- 1.1 Pipetear 200µL de muestra 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 Continuar al paso **2. Precipitación**.

B. Sangre total

- 1.1 Pipetear 200µL de muestra 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 Incubar durante 5 minutos a 56°C.
- 1.5 Continuar al paso **2. Precipitación**.

C. Hisopo en transporte medio / estabilizador

- 1.1 Presione el hisopo con la puntera en el medio de transporte para eliminar el material biológico (se puede centrifugar en un giro corto).
- 1.2 Desechar la muestra y la pipetear con 200 µl del medio de transporte que contiene el material biológico a la Tubo de Recogida de 1,5 mL (**R9**).
- 1.3 Adicionar 5µL de Proteinasa K (**R6**)* a la Tubo de Recogida de 1,5 mL que contiene la muestra y mezclar.
- 1.4 Pipetear 200µL de Tampón de Lisis (**R1**) y agitar vigorosamente (10-15 segundos).
- 1.5 Continuar al paso **2. Precipitación**.

D. Muestras viscosas (Semen y Esputo)

- 1.1 Pipetear 200µL de muestra a temperatura ambiente, en Tubo de Recogida de 1,5 mL (**R9**).
- Sugerencia:** Las muestras muy viscosas deben diluirse 1: 2 en PBS 1X.
- 1.3 Adicionar 5µL de Proteinasa K (**R6**)* a la Tubo de Recogida de 1,5 mL que contiene la muestra y mezclar.
 - 1.4 Pipetear 200µL de Tampón de Lisis (**R1**) y agitar vigorosamente (10-15 segundos).

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

1.5 Continuar al paso **2. Precipitación.**

E. Tejido

Materiales necesarios, pero no contenidos en el kit:

- Gral y pistilo o rompedor / homogeneizador de tejidos
- Nitrógeno líquido
- Jeringa de plástico estéril acoplada con aguja de 0.7-0.9 mm

Opcional: Agente reductor β -Mercaptoetanol o 10-20 mM de Ditiotreitól (DTT)

La extracción de ácidos nucleicos principalmente de muestras de tejido puede promover la liberación de grandes cantidades de endonucleasas (DNasa y RNasa) durante la etapa de lisis. Las endonucleasas reducen la producción y la calidad de los ácidos nucleicos, principalmente de las moléculas de RNA. Para la inactivación de RNasa, se puede usar un agente reductor (DTT o β -Mercaptoetanol) preservando así la integridad de los ácidos nucleicos.

La extracción puede realizarse sin la presencia del agente reductor, observando que los pasos de maceración y lisis deben realizarse de manera ágil evitando el calentamiento y/o descongelamiento de muestras de tejido previamente almacenadas a -20°C o -80°C .

Protocolo

1.1 Pesar entre 20-30 mg de tejido fresco a extraer.

Nota: Se recomienda almacenar los tejidos a extraer adecuadamente (-20°C o -80°C) para mantener la integridad de los ácidos nucleicos. Evite congelar y descongelar las muestras. Si se usa una solución estabilizadora comercial, el almacenamiento debe realizarse de acuerdo con el manual del fabricante.

1.2 Realice la maceración del tejido del gral y del pistilo con nitrógeno líquido.

Nota: La maceración o ruptura de tejidos también puede ser realizada por equipos desarrollados para este propósito, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

1.3 Transfiera la muestra macerada a un microtubo de 1.5mL (no suministrado).

1.4 Luego pipetear 200 μL de Tampón de Lisis (**R1**) y mezclar bien durante 1 minuto.

Opcional: Se puede agregar un agente reductor tal como β -Mercaptoetanol o Ditiotreitól 10-20 mM (DTT) al Tampón de lisis (**R1**) a una tasa del 1% del volumen de lisis, es decir, 2 μL de agente reductor por cada 200 μL de Tampón de Lisis (**R1**).

1.5 Homogeneice el tejido lisado pasando al menos 5 veces a través de una aguja (0.7 - 0.9 mm) acoplada a una jeringa de plástico estéril.

Nota: La homogeneización también puede realizarse mediante equipos desarrollados para este propósito, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

1.6 Centrifugar el tejido lisado a 15,000 x g durante 3 minutos.

1.7 Transfiera el sobrenadante a un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml (R9).

1.8 Continúe con el paso **2. Precipitación**.

2. Precipitación

2.1 Adicionar 5,6µL de Carrier RNA (**R5**)* preparado y mezclar.

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

2.3 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).

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

3. Conexión

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

3.2 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).

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

4. Lavado

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

4.2 Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

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

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

4.5 Centrifugar durante 1 minuto a 11.000 x g.

4.6 Transferir la Columna para nuevo Tubo de Recogida (**R8**) y desechar el Tubo de Recogida

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

con el filtrado.

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

4.8 Centrifugar durante 5 minutos a $\geq 15.000 \times g$.

5. Elución

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

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

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

5.4 Incubar a temperatura ambiente durante 3 minutos.

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

5.6 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

SIMBOLOGÍA UNIVERSAL



NÚMERO DEL CATÁLOGO



NÚMERO DE LOTE



FECHA DE FABRICACIÓN



ESTABLE HASTA
(último día del mês)



TEMPERATURA LIMITE
(conservar a)



CONTENIDO SUFICIENTE
PARA <N> TESTES



CONSULTAR INSTRUCCIONES
DE USO



DISPOSITIVO DE
DIAGNÓSTICO IN VITRO



PRECAUCIÓN



ELABORADO POR



CONTROL



CONTROL POSITIVO



CONTROL NEGATIVO



RIESGO BIOLÓGICO



INFLAMABLE



CORROSIVO



TÓXICO



PELIGRO



Extração de DNA/RNA Viral

English . Usage instructions

REF K204

Review: April/2020

INDEX

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

FUNCTION

Product developed for Viral DNA /RNA extraction and purification in sputum, cerebrospinal fluid, plasma, whole blood, semen, serum, swab, tissue and urine. 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	250 Preps
R1	1 x 11 mL	1 x 55 mL
R2	1 x 22 mL	1 x 110 mL
R3	1 x 7 mL	1 x 33 mL
R4	1 x 13 mL	1 x 30 mL
R5	1 x 300 µg	4 x 400 µg
R6	1 x 300 µL	1 x 1.5 mL
R7	1 x 50 unid	1 x 250 unid
R8	3 x 50 unid	3 x 250 unid
R9	2 x 50 unid	2 x 250 unid

REAGENTS

R1. Lysis Buffer: Guanidine Hydrochloride.

R2. Wash 1: Guanidine Hydrochloride, alcohol.

R3. Wash 2: Buffer solution.

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.

EQUIPMENTS AND OPERATIONAL 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 (0.5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL).
- 4- Microcentrifuge
- 5- Vortex
- 6- Heating block.
- 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 sputum, cerebrospinal fluid, plasma, whole blood, semen, serum, swab, tissue and urine. 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	Presentation	
	50 Preps	250 Preps
R3 - Wash 2 (concentrated)	Add 28 mL of Ethanol 96-100%	Add 132 mL of Ethanol 96-100%
R5 - Carrier RNA*	Add 300µL of RNase Free Water (R4)	Add 400µL 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 at 56°C.
- 3- Preheat the volume of the RNase free water (**R4**) reagent at 70°C to elution.

B. DNA/RNA extraction**1. Samples Lysis****A. Plasma, Suero, Líquido Cefalorraquídeo y Orina**

- 1.1 Pipette 200µL of sample 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 Continue on step **2. Precipitation**.

B. Whole blood

- 1.1 Pipette 200µL of sample 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 Incubate for 5 minutes at 56°C.
- 1.5 Continue on step **2. Precipitation**.

* After use, store at - 20° C.

C. Swab in transport medium / stabilizer

- 1.1 Press the swab with the tip in the transport medium to remove the biological material (it can be centrifuged in a short spin).
- 1.2 Discard the swab and pipette 200 μ L of the transport medium containing the biological material in a 1.5 mL Collector Tube (**R9**).
- 1.3 Add 5 μ L of Proteinase K (**R6**)* to the Collector Tube 1.5 mL with sample and mix.
- 1.4 Then, pipette 200 μ L of Lysis Buffer (**R1**) and shake vigorously (10-15 seconds).
- 1.5 Continue on step **2. Precipitation**.

D. Viscous samples (Semen and Sputum)

- 1.1 Pipette 200 μ L of sample at room temperature in Collector Tube 1.5 mL (**R9**).
- Suggestion:** Very viscous samples should be diluted 1: 2 in PBS 1X.
- 1.2 Add 5 μ L of Proteinase K (**R6**)* to the Collector Tube 1.5 mL with sample and mix.
 - 1.3 Then, pipette 200 μ L of Lysis Buffer (**R1**) and shake vigorously (10-15 seconds).
 - 1.4 Continue on step **2. Precipitation**.

E. Tissue

Materials needed but not contained in the kit:

- Gral and pistil or disruptor / homogenizer of the tissues.
- Liquid nitrogen.
- Needle Coupled Sterile Plastic Syringe (0.7-0.9mm).

Optional: Reducing Agent - β -Mercaptoethanol or 10 - 20 mM Dithiothreitol (DTT)
Extraction of nucleic acids mainly from tissue samples can promote the release of large amounts of endonucleases (DNase and RNase) during the lysis step. The endonucleases cause reduction in the production and quality of nucleic acids, mainly of RNA molecules. For RNase inactivation a reducing agent (DTT or β -Mercaptoethanol) can be used thus preserving the integrity of the nucleic acids. The extraction can be performed without the presence of the reducing agent, observing that the maceration and lysis steps should be performed in an agile manner avoiding the heating and / or thawing of tissue samples previously stored at -20°C or -80°C.

Protocol

- 1.1 To weigh between 20-30 mg of fresh tissue to be extracted.

Note: It is recommended to store the tissues to be extracted properly (-20°C or -80°C) to maintain the integrity of nucleic acids. Avoid freezing and thawing of samples. If commercial stabilizing solution is used, storage should be performed according to the manufacturer's manual.

- 1.2 Carry out the tissue maceration in gral and pistil using liquid nitrogen.

Note: Tissue maceration or rupture can also be performed by equipment developed for this purpose, according to the manufacturer's recommendations.

* After use, store at - 20° C.

- 1.3 Transfer the macerated sample to a 1.5 mL microtube (not supplied).
- 1.4 Then pipette 200µL of Lysis Buffer **(R1)** and mix thoroughly for 1 minute.

Optional: A reducing agent such as β -Mercaptoethanol or 10-20 mM Dithiothreitol (DTT) may be added to the Lysis Buffer **(R1)** at a rate of 1% of the lysis volume, for example, 2µL of reducing agent for each 200µL of Lysis Buffer **(R1)**.

- 1.5 Homogenize the lysed tissue by passing at least 5 times through a needle (0.7 - 0.9 mm) coupled to a sterile plastic syringe.

Note: Homogenization can also be performed by equipment developed for this purpose, according to the manufacturer's recommendations.

- 1.6 Centrifuge the lysed tissue at 15,000 x g for 3 minutes.
- 1.7 Transfer the supernatant to a new 1.5 mL collection tube **(R9)**.
- 1.8 Continue with step 2. **Precipitation.**

2. Precipitation

- 2.1 Add 5.6µL of Carrier RNA **(R5)*** prepared and mix.
- 2.2 Incubate for 3 minutes at room temperature (18-25°C).
- 2.3 Add 200µL of Ethanol (96-100%) to each Collector Tube 1.5 mL with sample and mix by vortexing (10-15 seconds).
- 2.4 Incubate for 5 minutes at room temperature (18-25°C).

3. Binding

- 3.1 Identify the Column **(R7)** into Collector Tube according to the sample which is being purified.
- 3.2 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).
- 3.3 After centrifugation, transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.

4. Washing

- 4.1 Add 400µL of Wash 1 **(R2)** to each Column containing sample.
- 4.2 Centrifuge for 1 minute at 11,000 x g.
- 4.3 Transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.
- 4.4 Add 400µL of Wash 2 **(R3)** prepared.
- 4.5 Centrifuge for 1 minute at 11,000 x g.
- 4.6 Transfer the Column to new Collector Tube **(R8)** and discard the Collector Tube with the filtrate.
- 4.7 Add 200µL of Wash 2 **(R3)** to Column.
- 4.8 Centrifuge for 5 minutes at $\geq 15,000 \times g$.

* After use, store at - 20° C.

5. Elution

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

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

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

5.4 Incubate at room temperature for 3 minutes.

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

5.6 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

UNIVERSAL SYMBOLOGY

	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		DANGER

BIO **GENE**

Bioclin · **QUIBASA**

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