

BIO GENE

Extração de DNA/RNA Viral

Instruções de uso

REF K204

Revisão: Novembro/2018

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	6
Procedimento	6
A . Preparo das Soluções de Trabalho	7
B . Extração do DNA/RNA	7
1. Lise das Amostras	7
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 sangue, urina, sêmen, líquido cefalorraquidiano (líquor), escarro, natorofaringe, fragmentos de tecidos humanos 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 250 preparações
R1	55 mL
R2	110 mL
R3	33 mL
R4	30 mL
R5	1,6 mg
R6	1,5 mL
R7	250 unid.
R8	750 unid.
R9	500 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 sangue, urina, sêmen, líquido cefalorraquidiano (liquor), escarro, nasorofaringe, fragmentos de tecidos humanos ou outros fluidos biológicos. As amostras devem ser coletadas e armazenadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares.

OBS.: Amostras sólidas devem ser previamente processadas para a extração.

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 132 mL de Etanol 96-100%
R5 - Carrier RNA*	Adicionar 400µL de Água Livre de RNase (R4) por frasco.

* Ressuspender os frascos de Carrier RNA (**R5**) conforme necessidade de uso e armazenar a - 20° C.

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

1. Lise das Amostras

- 1.1 Pipetar 200µL de amostra biológica 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 5,6µL de Carrier RNA (**R5**) preparado e homogeneizar.

Após o uso, o reagente Proteinase K (R6**) deve ser armazenado 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 $\geq 15.000 \times g$, 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		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 DIAGNOSTICO IN VITRO		TÓXICO
	CUIDADO		PERIGO

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