

Reagentes para Extração e Purificação de DNA

Código: 13-BR300-50 – Apresentação: 50 Extrações

Instruções de Uso

1. Uso pretendido

Os reagentes para extração e purificação de DNA, emprega colunas de sílica (cartuchos/filtros). O seu uso é recomendado para amostras de sangue total, plasma, soro, culturas de células, urina, amostra de coleta de *swab* nasofaríngeas.

O material genético extraído e purificado estará pronto para ser utilizado em *kits* de biologia molecular como PCR, RT-PCR, RT-qPCR disponíveis no mercado.

2. Características do Produto

Os reagentes para extração de DNA é um sistema genérico que utiliza a tecnologia de colunas de sílica com capacidade de ligação para isolamento e purificação de DNA de amostras de sangue total, plasma, soro, culturas de células, urina, amostras de coleta de *swabs* nasofaríngeas para procedimentos de diagnóstico *in vitro*.

2.1 Composição dos reagentes:

Componentes (50 extrações)	Quantidade de mL fornecida por frasco	Quantidade
Hemalise-RBC 10X	9,0 mL	01
Tampão de Lise	20,0 mL	01
Solução de lavagem A	30,0 mL	01
Solução de lavagem B	30,0 mL	01
Tampão de Eluição	5,0 mL	01
Coluna de Sílica	-	50 unid.
Tubo coletor	-	50 nid.

2.2 Especificações

Os reagentes oferecem uma extração em coluna de sílica com excelente rendimento. Uso recomendado com matrizes biológicas respiratórias, sangue e meios de transporte. O DNA extraído poderá ser utilizado em técnicas de biologia molecular, incluindo reação em cadeia da polimerase quantitativa (PCR, qPCR).

2.3 Equipamentos, reagentes e insumos não fornecidos

- Centrífuga - 20.000 x g (14.000 rpm),
- Micropipetas e ponteiras de 1-10 μ L – 100-1000 μ L
- Agitador tipo Vórtex,
- Bloco de aquecimento, Banho Maria, Banho seco ou estufa, para incubação em 56°C.
- Etanol absoluto (95-100%),
- Microtubos de 1,5mL e 2mL,
- Tubos graduados, tipo Falcon (15mL e 50mL).

- Luvas descartáveis,

2.4 Preparo de reagente

Tampão de Lise, Tampão de Lavagem A e B e tampão de eluição: reagentes prontos-para-uso, indicar a data do primeiro uso.

Preparo de Hemalise na concentração 1X:

Para cada amostra serão necessário 1,8 mL de solução de Hemalise 1X.

Diluir 1:10 a solução de Hemalise-RBC 10X em água ultrapura, sendo 1 parte de Hemalise-RBC 10X e 9 partes de água ultrapura, deixando na concentração 1X.

3. Armazenamento e transporte

Os componentes podem ser transportados em temperatura ambiente (10° a 30°C) e são estáveis até a data de validade descrita na embalagem. O tampão de lise e o Tampão de lavagem A podem exibir precipitados devido às baixas temperaturas. Se isso ocorrer, aquecer o frasco em temperaturas entre 55°C a 65°C homogeneizando ocasionalmente até a dissolução completa.

4. Validade

Os reagentes para **Extração e Purificação de DNA** tem validade de 12 meses quando mantidos fechados e armazenados corretamente.

5. Informação de Segurança

- Os reagentes devem ser utilizados somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
- Todo o pessoal envolvido na execução do ensaio deve utilizar equipamentos de proteção individual. Além disso, todos devem ser treinados em procedimentos de biossegurança, como recomendado pela legislação em vigor.
- O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes como poeira ou agentes microbianos transportados pelo ar.
- Após o recebimento dos reagentes, verificar se as embalagens dos componentes estão danificadas ou se há vazamento dos líquidos. Proteger-se adequadamente e caso seja necessário realizar a reclamação correspondente.
- Não utilizar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
- Não trocar os componentes diferentes, se não forem do mesmo lote.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
- Armazenar os químicos e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.
- Para minimizar risco de contaminações é recomendado trabalhar em cabine de fluxo laminar.
- Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiras com filtro.
- Evitar contaminação cruzada entre os reagentes dos reagentes utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiras com filtro.

- Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a NOVA BIOTECNOLOGIA.

6. Procedimento

Sangue total, soro, plasma, urina, cultura de células, amostra de coleta de *swab* nasofaríngeas, podem ser processados com os reagentes de extração de DNA em coluna. Para uma purificação satisfatória é importante obter material homogêneo, limpo e não viscoso antes de carregar as colunas. Desta forma, é importante verificar a existência de precipitados em todas as amostras (especialmente amostras antigas e congeladas).

6.1 Preparação das amostras

Os reagentes para extração de DNA foram desenvolvidos para purificação a partir de **200µL** de amostras de sangue total, soro, plasma, cultura de células. Para amostras nasofaríngeas a partir de **300µL**. Para amostras de urina centrifugar 2mL para uso do *pellet* (vide 7.1).

Amostra de Sangue total: pré-tratamento:

- Em microtubo de 2 mL, adicionar **200 µL de sangue total** com anticoagulante.
- A seguir, adicionar **1,8 mL de solução de hemalise 1X**.
- Inverter o microtubo por 10 vezes para homogeneizar a solução de hemalise.
- Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar o microtubo a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 3 minutos.
- Desprezar o máximo possível do sobrenadante pipetando no lado oposto do *pellet*.
- Seguir para o protocolo geral, item 7.1.

Amostra de urina: pré-tratamento:

- Em um microtubo de 2 mL adicionar 2 mL de urina.
- Centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 5 minutos,
- Desprezar o máximo possível do sobrenadante pipetando no lado oposto do *pellet*.
- Seguir para o protocolo geral item 7.1.

7. Protocolo geral

7.1 Em um microtubo de 2 mL com a amostra (volume sugerido no item 6.1), adicionar **400 µL do Tampão de Lise**.

7.2 Vortexar o microtubo por 15 segundos.

7.3 Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.

7.4 Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.

7.5 Adicionar ao mesmo microtubo **200 µL de Etanol Absoluto** (Não fornecido). Homogeneizar imediatamente por inversão.

NOTA: a homogeneização deve ser imediata para evitar qualquer precipitação irregular do DNA devido as altas concentrações do etanol.

7.6 Vortexar o microtubo por 15 segundos.

7.7 Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.

7.8 Transferir os **600 µL da amostra preparada** na coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.

NOTA: Não descartar o volume restante da amostra preparada (aproximadamente 500µL)

7.9 Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.

7.10 Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.

7.11 Se necessário repetir o item 8 e 9, caso tenha ficado o preparo da amostra no microtubo.

7.12 Adicionar **600 µL do Tampão de Lavagem A** na coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.

7.13 Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.

7.14 Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.

7.15 Adicionar **600 µL do Tampão de Lavagem B** na coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.

7.16 Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 3 minutos.

7.17 Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.

7.18 Centrifugar novamente a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 1 minuto para remover completamente a solução de lavagem.

7.19 Transferir a coluna de sílica para um microtubo de 1,5 mL.

7.20 Aplicar **100 µL do Tampão de Eluição** diretamente a membrana de sílica.

7.21 Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.

7.22 Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.

7.23 Manter o DNA eluído a -20°C para armazenamento e/ou transporte ou utilizá-lo imediatamente.

8. Controle de Qualidade

PROBLEMA	CAUSA PROVÁVEL	RECOMENDAÇÃO
Baixo desempenho do DNA eluído em aplicações laboratoriais	Amostras antigas ou armazenadas inadequadamente	Evitar congelamento/descongelamento repetitivo
	Inibição ineficiente de nuclease durante a fase de lise da amostra	Verificar se o tampão de lise tenha sido misturado homogeneamente com a amostra
	O etanol não foi adicionado após a lise da amostra	Repita a purificação com nova alíquota de amostra

	Tampão de Lise e Tampão de lavagem A não estão totalmente homogêneos	Corrigir a homogeneização dos tampões, verificando que estejam completamente dissolvidos sem precipitado nem cristais devido à baixa temperatura
	A coluna de sílica não foi suficientemente seca antes da adição do tampão de eluição	Verificar que a coluna seja centrifugada após a adição do tampão de lavagem B, a velocidade máxima por 3 minutos seguida por 1 minuto
	DNA degradado	Processar a amostra imediatamente ou se for armazenada, verificar para que seja descongelada gentilmente em baixa temperatura

9. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia dos **Reagentes para Extração e Purificação de DNA** por ela revendidos contra defeitos de produção pelo período de validade do produto, salvo especificações em contrário a constar da proposta.

- A garantia abrange defeitos de produção.
- Exceções na garantia:
- Todos os produtos com defeitos oriundos de mau uso, imperícia, conservação ou armazenagem inadequada.
- Quando não for utilizado de acordo com sua finalidade de aplicação.

10. Informações do Fabricante

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE

CEP: 06.715-864 - COTIA/SP - BRASIL

CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA - CRBM 20.951/1

11. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br

sac@novabiotecnologia.com.br