

Reagentes para Extração e Purificação de RNA
Código: 13-BR850-50 - Apresentação: 50 extrações
Instruções de Uso

1. Uso pretendido

Os reagentes para extração e purificação de RNA, empregam colunas de sílica (cartuchos/filtro). O seu uso é recomendado para sangue total, plasma, soro, urina, cultura de células, amostras coletadas em *swab* nasofaríngeo.

2. Características do Produto

Os reagentes para extração e purificação de RNA compõem um sistema genérico que utiliza a tecnologia de colunas de sílica com elevada capacidade de ligação para isolamento e purificação de RNA de amostras de plasma, soro, sangue total, urina, cultivo celular, amostras coletadas em *swab* nasofaríngeo para procedimentos de diagnóstico *in vitro*. O Carreador quando adicionado ao tampão de lise tem o objetivo de otimizar a extração de RNA. A Proteinase K é utilizada para facilitar a lise de proteínas presentes nas amostras.

2.1. Composição do produto

Componentes (50 extrações)	Volume	Quantidade
Hemalise-RBC 10X	9,0 mL	01
Carreador de RNA liofilizado	-	01
Proteinase K (PK) liofilizada	-	01
Diluente PA/PK	1,0 mL	01
Tampão de Lise	20,0 mL	01
Tampão de lavagem A concentrado	16,5 mL	01
Tampão de lavagem B concentrado	9,0 mL	01
Tampão de Eluição	2,5 mL	01
Coluna de Sílica	-	50 unid.
Tubo coletor	-	50 unid.

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 RNA extraído poderá ser utilizado em técnicas de biologia molecular, incluindo reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR, RT-qPCR).

2.3 Equipamentos, reagentes e insumos necessários, mas, 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 dos reagentes

A **Proteinase K** deverá ser diluída, adicionando 500 μ L (reagente para 50 extrações) do Diluente PA/PK. Após reconstituído se recomenda armazenar em -20°C . Para cada amostra a ser extraída, adicionar o volume de 10 μ L da Proteinase K já reconstituído.

O **Carreador de RNA** deverá ser reconstituído adicionando 250 μ L (reagente para 50 extrações) do Diluente PA/PK. Para cada amostra a ser extraída, adicionar o volume de 5 μ L de Carreador de RNA já reconstituído.

RECOMENDAÇÃO: Preparar alíquotas de carreador de RNA com volumes menores, para evitar repetidos ciclos de congelamento e descongelamento.

Preparo de Hemalise na concentração 1X:

Para cada amostra serão necessários 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.

Tampão de Lavagem A e **Tampão de Lavagem B** são fornecidos concentrados. Antes do primeiro uso adicionar a quantidade de etanol absoluto (95-100%) conforme indicado na tabela e nos frascos:

Tampão de Lavagem A Concentrado	Etanol absoluto 95-100% adicionar	Volume final
16,5 mL	13,5 mL	30 mL

Tampão de Lavagem B concentrado	Etanol absoluto 95-100% adicionar	Volume final
9,0 mL	21,0 mL	30 mL

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 com precipitados, entre 55°C e 65°C homogeneizando ocasionalmente até a dissolução completa.

4. Validade

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

5. Informação de Segurança

- 5.1 Os reagentes devem ser utilizados somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
- 5.2 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.
- 5.3 O ambiente do laboratório deve ser controlado, a fim de evitar contaminantes como poeira ou agentes microbianos transportados pelo ar.
- 5.4 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.
- 5.5 Não utilizar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
- 5.6 Não trocar os componentes diferentes, se não forem do mesmo lote.
- 5.7 Não utilizar os reagentes após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
- 5.8 Armazenar os químicos e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.
- 5.9 Para minimizar risco de contaminações é recomendado trabalhar em cabine de fluxo laminar.
- 5.10 Evitar contaminação cruzada das amostras utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiras com filtro.
- 5.11 Evitar contaminação cruzada entre os reagentes dos reagentes utilizando ponteiras descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiras com filtro.
- 5.12 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* nasofaríngea. Podem ser processados com os reagentes de extração de RNA 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 Preparações das amostras

Os reagentes para extração de RNA 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:

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

Amostras de urina: pré-tratamento:

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

7. Protocolo geral

- 7.1 Em um microtubo de 2mL com a amostra; adicionar **400 µL do Tampão de Lise**.
- 7.2 Adicionar 10µL de Proteinase K.
- 7.3 *Vortexar* o microtubo por 15 segundos.
- 7.4 Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.
- 7.5 Incubar a 56°C (Banho Maria, Banho seco ou estufa) por 10 minutos.
- 7.6 Retirar e deixar em temperatura ambiente (10-30°C) por 2 minutos.
- 7.7 Adicionar 5 µL do carreador de RNA e homogeneizar em vórtex por 15 segundos.
- 7.8 Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.
- 7.9 Incubar em temperatura ambiente (10-30°C) por 10 minutos.
- 7.10 Adicionar ao mesmo microtubo **450µL de Etanol Absoluto** (não fornecido).
Homogeneizar imediatamente por inversão.

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

- 7.11 *Vortexar* o microtubo por 15 segundos.
- 7.12 Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.
- 7.13 Transferir **600 µL da amostra preparada** para coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.

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

- 7.14 Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
- 7.15 Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.

- 7.16** Repetir o item 7.13 a 7.15, para transferir o restante do preparado da amostra.
- 7.17** Adicionar **500 µL do Tampão de Lavagem A** na coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.
- 7.18** Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
- 7.19** Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.
- 7.20** Adicionar **500 µL do Tampão de Lavagem B** na coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.
- 7.21** Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
- 7.22** Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.
- 7.23** Centrifugar novamente a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 3 minutos para remover completamente a solução de lavagem.
- 7.24** Transferir a coluna de sílica para um microtubo de 1,5 mL (não fornecido).
- 7.25** Aplicar **50 µL do Tampão de Eluição** diretamente a membrana de sílica.
- 7.26** Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
- 7.27** Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
- 7.28** Manter o RNA eluído a -20°C para armazenamento e/ou transporte ou utilizá-lo imediatamente.

8. Controle da Qualidade

PROBLEMA	CAUSA PROVÁVEL	RECOMENDAÇÃO
Baixo rendimento do RNA extraído, na leitura em espectrofotômetro	Amostras antigas ou armazenadas inadequadamente	Evitar congelamento/descongelamento repetitivo.
	Carreador de RNA não está adicionado ao Tampão de lise	Preparar o Tampão de lise com o carreador de RNA conforme descrito previamente.
	Baixa qualidade do carreador de RNA, pode ter degradado	Verificar que o carreador de RNA esteja separado em alíquotas e só possa ser descongelado por uma única vez. Certifique-se de que qualquer precipitado formado no Tampão de lise esteja completamente dissolvido.
	Inibição ineficiente de nuclease	Verificar de que o Tampão de

	durante a fase lise da amostra	lise tenha sido misturado homogeneamente com a <i>mix</i> da amostra e da proteinase K.
	O etanol não foi adicionado após a Lise da amostra	Repetir a purificação com nova alíquota da amostra.
	Tampão de lavagem A e Tampão de lavagem B não estão totalmente homogêneos	Corrigir a homogeneização dos tampões, verificando que estejam completamente dissolvidos sem precipitados nem cristais por baixa temperatura.
Baixo desempenho do RNA eluído em aplicações laboratoriais	A coluna não foi suficientemente seca antes da adição do Tampão de eluição	Verificar que a coluna seja centrifugada e seca à velocidade máxima por 3 minutos após a adição de Tampão de lavagem B
	RNA degradado	Processar a amostra imediatamente ou se a amostra for armazenada para uso posterior, verifique para que esta seja descongelada gentilmente em baixa temperatura. Usar material de plástico e ponteiros descartáveis. Certifique-se que a purificação seja realizada em um ambiente livre de RNase.
	RNA eluído contém traços de etanol	Assegure-se que a etapa de secagem da coluna é realizada antes da eluição.
	A quantidade de Carreador de RNA adicionada é inadequada	Verificar se a reconstituição foi realizada com o volume adequado e está bem homogênea.
	Baixa concentração de RNA eluído	Reduzir a quantidade do Tampão de Eluição, o volume mínimo sugerido é de 30 µL.

9. Garantia da Qualidade

A **NOVA BIOTECNOLOGIA** fornece garantia dos produtos por ela fornecido 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.

NOVA BIOTECNOLOGIA LTDA.

R. PASADENA, 235 - PARQUE INDUSTRIAL SAN JOSE
CEP: 06715-864 - COTIA/SP - BRASIL
CNPJ: 24.096.423/0001-15

RESPONSÁVEL TÉCNICO

Dra. ELIZABETH CORTEZ HERRERA - CRBM 20.951/1

10. Atendimento ao Consumidor

Tel.: +55 (11) 4243-2356

www.novabiotecnologia.com.br

e-mail: assessoria@novabiotecnologia.com.br

sac@novabiotecnologia.com.br