

Kit para Extração e Purificação de RNA - RUO**13-BR850-50 - 50 extrações****Ficha de Instruções de Uso****1. Uso pretendido**

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

2. Características do Produto

O Kit para extração e purificação de RNA compõe 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* nasofaríngea 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	Código
Hemalise-RBC 10X	9,0 mL	01	13-20151
Tampão de Lise	20,0 mL	01	13-BR851
Tampão de lavagem A concentrado	16,5 mL	01	13-BR852
Tampão de lavagem B concentrado	9,0 mL	01	13-BR853
Tampão de Eluição	2,5 mL	01	13-BR854
Diluyente PA/PK	1,0 mL	01	13-BR855
Proteinase K (PK) liofilizada	-	01	13-BR856
Carreador de RNA liofilizado (PA)	-	01	13-BR857
Coluna de Sílica	-	50 unid.	
Tubo coletor	-	50 unid.	

2.2 Especificações

O *Kit* oferece uma extração em coluna de sílica com excelente rendimento. Uso recomendado com matrizes biológicas respiratórias, sangue.

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 ponteiros de 1-10µL – 100-1000µL,
- 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,
- Luvas descartáveis.

2.4 Preparo dos reagentes

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

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

RECOMENDAÇÃO: Após reconstituir cada frasco de carreador recomenda-se armazenar em -20°C. É recomendável também, separar alíquotas de carreador de RNA em 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 e armazenados 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. A Proteinase K e o Carreador após reconstituídos, devem ser armazenados em temperatura de -20°C.

4. Validade

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

5. Informações 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 do *Kit*, verificar se as embalagens dos componentes estão danificadas ou se há vazamento dos líquidos. Proteger-se adequadamente e caso seja necessário realizar a reclamação ao SAC.
- 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 ponteiros descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiros com filtro.
- Evitar contaminação cruzada entre os reagentes do *Kit*, utilizando ponteiros descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiros 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* nasofaríngea, podem ser processados com os reagentes do *Kit* 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

O *Kit* para extração de RNA foi desenvolvido para purificação de **200 µL** de amostras de sangue total, soro, plasma, cultura de células. Para amostras nasofaríngeas de **300 µL**. Para amostras de urina centrifugar 2mL para uso do *pellet*.

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

1. Em um microtubo de 2mL com a amostra; adicionar **400 µL do Tampão de Lise**.
2. Adicionar 10µL de Proteinase K.
3. *Vortexar* o microtubo por 15 segundos.
4. Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.
5. Incubar a 56°C (Banho Maria, Banho seco ou estufa) por 10 minutos.
6. Retirar e deixar em temperatura ambiente (10-30°C) por 2 minutos.
7. Adicionar 5 µL do carreador de RNA e homogeneizar em vórtex por 15 segundos.
8. Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.
9. Incubar em temperatura ambiente (10-30°C) por 10 minutos.
10. Adicionar ao mesmo microtubo **450 µL 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.

11. *Vortexar* o microtubo por 15 segundos.
12. Centrifugar rapidamente para remover as gotas de líquido da tampa do microtubo.
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 500 µL)

14. Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
15. Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.
16. Repetir o item 7.13 a 7.15, para transferir o restante do preparado da amostra.
17. Adicionar **500 µL do Tampão de Lavagem A** na coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.
18. Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
19. Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.
20. Adicionar **500 µL do Tampão de Lavagem B** na coluna de sílica já acoplada ao tubo coletor.
21. Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 3 minutos.
22. Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente a coluna de sílica.
23. Centrifugar novamente a 20.000 x g (14.000 rpm) durante 1 minuto para remover completamente a solução de lavagem.
24. Transferir a coluna de sílica para um microtubo de 1,5 mL (não fornecido).
25. Aplicar **50 µL do Tampão de Eluição** diretamente à membrana de sílica.
26. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
27. Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6.000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
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
	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.

Baixo rendimento do RNA extraído, na leitura em espectrofotômetro	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 durante a fase lise da amostra	Verificar de que o Tampão de lise tenha sido misturado homogêneamente 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 e 1 minuto, 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 20951

10. Atendimento ao Consumidor

Tel.: +55 (11) 4243-2356

www.novabiotechologia.com.br

E-mail: assessoria@novabiotechologia.com.br sac@novabiotechologia.com.br