

Kit para Extração e Purificação de DNA
13-BR300-50 – 50 Extrações
Ficha de Instruções de Uso

1. Uso pretendido

É um kit para extração e purificação de DNA, que emprega colunas de sílica (cartuchos/filtros). O seu uso é recomendado para amostras de sangue total, plasma, soro, cultura de células, urina, amostra de coleta de *swabs* 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. Característica do Produto

O *kit* para extração de DNA é um sistema genérico que utiliza a tecnologia de colunas de sílica com elevada 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 do kit

Componentes (50 extrações)	Volume	Quantidade	Código
Hemalise-RBC 10X	9,0 mL	01	13-20151
Tampão de Lise	20,0 mL	01	13-BR301
Solução de lavagem A	30,0 mL	01	13-BR302
Solução de lavagem B	30,0 mL	01	13-BR303
Tampão de Eluição	2,5 mL	01	13-BR304
Coluna de Sílica	-	50 unid.	
Tubo coletor	-	50 unid.	

2.2 Equipamentos, reagentes e insumos não fornecidos

- Minicentrífuga (*Spin*), centrífuga - 20.000 x g (14.000 rpm),
- Agitador tipo *Vórtex*,
- Micropipetas e ponteiros,
- Etanol absoluto (95-100%),
- Microtubos de 1,5mL e 2mL,
- Luvas descartáveis.

3. Armazenamento e transporte

Os componentes do *kit* 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

O **Kit para Extração e Purificação de DNA** tem validade de 12 meses quando mantido fechado e armazenado corretamente.

5. Informação de Segurança

- 5.1 o *kit* deve ser utilizado somente por pessoal técnico qualificado e devidamente treinado.
- 5.2 todo o pessoal envolvido na execução do ensaio deve utilizar equipamentos 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 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.
- 5.5 não utilizar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.
- 5.6 não trocar componentes de *kits* diferentes, se não forem do mesmo lote.
- 5.7 não utilizar o *kit* após a data de validade apresentada na etiqueta externa.
- 5.8 armazenar os componentes 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 ponteiros descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiros com filtro.
- 5.11 evitar contaminação cruzada entre os reagentes do *kit* utilizando ponteiros descartáveis e trocando-as após cada pipetagem. Utilizar ponteiros 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* nasofaríngeas podem ser processados com o *kit* 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).

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, deixando na concentração 1X.

6.1 Preparação das amostras

O *Kit* para extração de DNA foi desenvolvido 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*.

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 em 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.

Amostra 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.

7. Protocolo geral

- 7.1. Em um microtubo de 2mL 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 em 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 às 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.

- 7.9. Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6000 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 7.8 a 7.10, 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 6000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
- 7.14. Descartar o líquido do tubo coletor e acoplar novamente à 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 6000 x g (8.000 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 entre **30 e 50 µL do Tampão de Eluição** diretamente à membrana de sílica.
- 7.21. Incubar em temperatura ambiente por 2 minutos.
- 7.22. Fechar a tampa da coluna de sílica e centrifugar a 6000 x g (8.000 rpm) durante 1 minuto.
- 7.23. Manter o DNA eluído em -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 do produto **Kit para Extração e Purificação de DNA** por ela fornecida 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 20951

11. Atendimento ao Consumidor

Tel. +55 (11) 4243-2356

www.novabiotechologia.com.br

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