

BIOPUR KIT EXTRAÇÃO MINI SPIN PLUS

Instruções de Uso

1. USO PRETENDIDO

O **BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus** é a ferramenta ideal para uma extração e purificação manual simples, rápida e eficiente de DNA genômico empregando tubo-filtro. Devido ao alto grau de pureza, o DNA extraído está pronto para ser utilizado em análises de diagnóstico *in vitro* e em outras aplicações. É aplicado para as seguintes amostras:

- Sangue total de mamíferos;
- Creme leucocitário (buffy coat);
- Sangue de não mamíferos, tais como aves e peixes;
- Fluido cerebrospinal (CSF);
- Medula óssea;
- Cartão Biopur com amostra de sangue total.

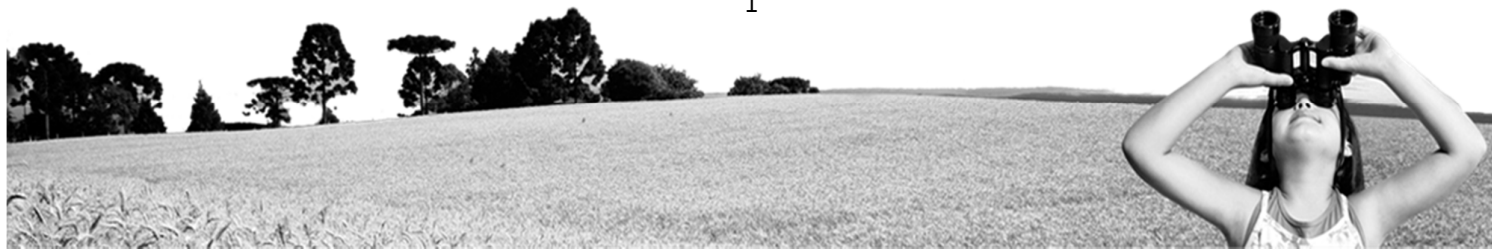
Não existe estudo de validação publicado para a extração de DNA genômico de células isoladas ou oriundas de cultura, tecido, swabs, ou fluidos corpóreos livres de células, como fluido sinovial e urina, fezes, bactérias, fungos, parasitas ou para a extração de RNA total. A aplicação do kit para a extração e purificação de DNA viral não foi avaliada. Para outras validações entrar em contato com o nosso Laboratório.

O **BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus** é designado para o processamento de múltiplas amostras simultaneamente. O procedimento é rápido e não requer uma extração com fenol e clorofórmio ou precipitação em etanol, requerendo mínima interação com o usuário. O procedimento foi desenvolvido para evitar contaminação cruzada de amostras e permitir um manuseio seguro de amostras potencialmente contaminantes. Devido à alta pureza, o DNA genômico extraído fica pronto para uso em um grande painel de aplicações em Biologia Molecular ou poderá ser armazenado a -20°C para uso subsequente.

Aplicações em Biologia Molecular:

- PCR convencional;
- Digestão por Enzima de Restrição;
- Análises SNP;
- Tipagem HLA;
- Clonagem.

O produto é indicado para uso por profissionais treinados em técnicas de biologia molecular. Quaisquer resultados gerados utilizando o procedimento de preparação de amostras em conjunto com qualquer análise de diagnóstico devem ser interpretados considerando outras conclusões clínicas e laboratoriais. Para minimizar irregularidades nos resultados de diagnósticos, controles adequados devem ser empregados.



2. CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO

AMOSTRA INICIAL	RENDIMENTO	TEMPO	RAZÃO
1 – 200 µL sangue total de mamíferos 1 – 30 µL de creme leucocitário (buffy coat) 1 – 25 µL de sangue de não mamíferos 1 – 200 µL fluido cerebrospinal 1 – 20 µL de medula óssea	Até 10 µg (em média 6 µg), dependendo da qualidade, origem e idade da amostra, seu transporte e armazenamento	30 minutos	A260/A280: 1.7 – 2.0
2 a 4 discos de 2 mm de cartão Biopur com amostra de sangue total	Até 160 ng por disco, dependendo da aplicação da amostra, secagem, modo e tempo de armazenamento	45 minutos	A260/A280: dependente da aplicação da amostra, secagem, modo e tempo de armazenamento

A quantidade de DNA purificado depende do tipo de amostra e do número de células na amostra (que varia conforme a idade do paciente e seu estado de saúde - e conforme condições de transporte, armazenamento e idade das amostras).

Normalmente, uma amostra de 200 µL de sangue total (contagem de células brancas – intervalo de 3×10^6 a 1×10^7 células/mL) de um indivíduo sadio rende de 3 a 10 µg de DNA. O rendimento típico do kit é de até 10 µg de DNA. Se uma amostra de sangue total for tratada com soluções tampão contendo anticoagulantes, a contagem total de leucócitos diminuirá e o rendimento de DNA do processo de extração será reduzido. O rendimento pode ser aumentado, se o tempo de incubação com o Tampão de Eluição pré-aquecido for prolongado.

Para a maioria das amostras de sangue total, uma única eluição com 200 µL de Tampão de Eluição é suficiente. Para amostras com elevada concentração de células brancas, aproximadamente 80% do DNA será eluído nos primeiros 200 µL e até 20% mais nos seguintes 200 µL.

O rendimento e a qualidade do DNA genômico extraído é aplicável em qualquer sistema de detecção de diagnóstico molecular. Os testes de diagnóstico devem ser realizados de acordo com as especificações do fabricante.

3. COMPOSIÇÃO DO KIT

INFORMAÇÕES PRINCIPAIS	10 EXTRAÇÕES (Amostra)	50 EXTRAÇÕES	250 EXTRAÇÕES
Código do produto	BP099-10	BP100-50	BP101-250
Tampão de Lise A	1 x 2,2 mL	1 x 11 mL	1 x 52 mL
Proteinase K *	1 x Tipo D* (volume final 1x500 µL)	1 x Tipo G* (volume final 1x1100 µL)	5 x Tipo G* (volume final 5x1100 µL)
Tampão de Ligação B6	1 x 4,4 mL	1 x 22 mL	1 x 105 mL
Tampão de Lavagem I *	1 x 3 mL* (volume final 1x6 mL)	1 x 15 mL* (volume final 1x30 mL)	1 x 65 mL* (volume final 1x130 mL)
Tampão de Lavagem II *	1 x 3,6 mL* (volume final 1x12 mL)	1 x 15 mL* (volume final 1x50 mL)	1 x 63 mL* (volume final 1x210 mL)
Tampão de Eluição	1 x 2,2 mL	1 x 12 mL	2 x 27 mL
Tubo Spin RTA - Amarelo	10 unid.	50 unid.	5 x 50 unid.
Tubo de Coleta RTA - Amarelo	10 unid.	50 unid.	5 x 50 unid.
Tubo de Eluição 1,5 mL	10 unid.	50 unid.	5 x 50 unid.
Manual de Instruções	1 unid.	1 unid.	1 unid.

* Verificar item 8 - Reagentes e Equipamentos necessários, mas não fornecidos e item 9 – Preparo dos Reagentes.



4. ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

Todos os componentes do **BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus** devem ser armazenados em temperatura ambiente entre 15 e 30°C e, sob estas condições, são estáveis até a data de validade impressa na embalagem.

OBS.: Após abertura do kit, armazenar a Proteinase K liofilizada em temperatura refrigerada (2 a 8°C).

Proteinase K

A Proteinase K reconstituída deve ser armazenada a -20°C; recomenda-se dividir a solução em alíquotas para o armazenamento no freezer. Esta solução pode, eventualmente, apresentar aspecto leitoso, principalmente em função de repetidos ciclos de congelamento e descongelamento, armazenamento prolongado ou diluição errada; situações tais que devem ser evitadas. Entretanto, verificou-se que esse aspecto leitoso não interfere no desempenho do produto. Não é recomendado dar spin na solução leitosa, pois pode haver formação de pellet, levando à perda de atividade.

Tampões de Lavagem

Os Tampões de Lavagem I e II nos quais foi adicionado etanol devem ser apropriadamente fechados e armazenados em temperatura ambiente entre 15 e 30°C.

Antes de cada uso, ter certeza que os componentes estão em temperatura ambiente. Se alguma solução apresentar precipitado, dissolva-o com cuidadoso aquecimento até 30°C.

5. INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA

Sempre que estiver trabalhando com soluções químicas e amostras biológicas, EPIs são recomendados conforme normas de segurança regulamentadas.

Depois de receber o kit verificar se as embalagens dos componentes estão danificadas ou se há vazamento dos líquidos. Se os frascos de tampões estiverem danificados ou com vazamento, usar luvas e óculos de proteção quando descartar os frascos para evitar acidentes.

Não usar componentes danificados, pois eles podem gerar baixo rendimento.

Sempre trocar as ponteiros entre as transferências de líquidos para evitar a contaminação cruzada. É recomendado o uso de ponteiros com filtro.

Toda a centrifugação deve ser realizada em temperatura ambiente.

Não misturar componentes de kits diferentes, se não forem o mesmo lote.

Evitar contaminação microbiana dos reagentes do kit.

Para minimizar risco de infecções é recomendado trabalhar em câmara de fluxo laminar.

Este kit deve ser usado apenas por pessoal treinado.

Armazenar os químicos e plásticos em condições próprias para uso em laboratório.

Os resíduos gerados pelo uso dos kits não foram testados. Contaminações causadas pelos resíduos são raríssimas, mas não podem ser completamente descartadas. Portanto, os resíduos devem ser considerados como material infeccioso e devem ser manuseados de acordo com as normas de segurança regulamentadas.

Caso sejam necessárias mais informações a respeito do produto, favor entrar em contato com a Biometrix solicitando a Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico - FISPQ do produto.

Ver a seguir classificação de riscos e frases de segurança utilizadas internacionalmente, que se aplicam aos componentes do **BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus**:



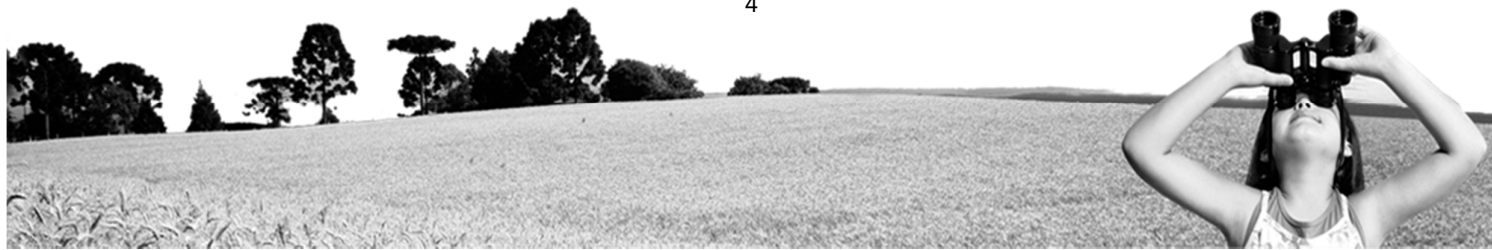
PRODUTOS	RISCOS
Tampão de Lise A	R36, S2, S24
Tampão de Ligação B6	R11, 36, 67, S2, 7, 16, S24/25/26
Proteinase K	R36/37/38, S42, S2, S22, 24, 26, S36/37
Tampão de Lavagem I	R20/21/22, 32, S2, 13
LEGENDA DOS RISCOS	
R1	Altamente inflamável.
R20/21/22	Nocivo por inalação, contato com a pele e se ingeridos.
R32	Contato com gases muito tóxicos liberados de ácidos.
R36	Irritante para os olhos.
R36/37/38	Irritante para os olhos, sistema respiratório e pele.
R42	Pode causar sensibilização pela inalação.
R52/53	Nocivo para organismos aquáticos; pode causar efeitos adversos, em longo prazo, no ambiente aquático.
R67	Vapores podem causar sonolência e tonturas.
S2	Manter fora do alcance das crianças.
S7	Manter o recipiente bem fechado.
S13	Manter longe de comida, bebida e comida de animais.
S16	Manter longe de fontes de ignição. Não fumar.
S22	Não inalar o pó.
S24/25	Evitar contato com a pele e olhos.
S26	Em caso de contato com os olhos, lavar imediatamente com água abundante e procurar aconselhamento médico.
S36/37	Usar roupas e luvas protetoras e adequadas.
S61	Evitar liberação no meio ambiente. Consultar instruções especiais / ficha de segurança.

6. AMOSTRAGEM E ARMAZENAMENTO, DE ACORDO COM O TIPO DE AMOSTRA BIOLÓGICA

Sangue Total e Creme Leucocitário (Buffy coat)

Os melhores resultados são obtidos empregando amostras frescas. Amostras de sangue total (conservadas com EDTA ou citrato) podem ser armazenadas a temperatura ambiente por 2 a 3 horas; para uma armazenagem rápida (até 24 horas) as amostras podem ser armazenadas a 4°C. Para longos períodos de armazenamento, é recomendado o congelamento das amostras a -20°C ou -80°C. Congelamento e descongelamentos seguidos antes da extração do DNA devem ser evitados. Se houver a presença de crioprecipitados (formados no descongelamento de amostras congeladas) evitar aspirá-los, pois eles poderão entupir a membrana do tubo. Vários tipos de tubos primários, sistema de coleta de sangue e anticoagulantes podem ser usados para a coleta de sangue, com exceção de heparina.

Creme leucocitário é a fração do sangue total rica em células brancas. Para preparar e extrair a camada de creme leucocitário recomenda-se o seguinte processo. Usar uma amostra de sangue total (anticoagulantes: EDTA ou citrato) com uma fração sedimento celular proveniente de um repouso durante a noite a 4°C. A camada clara logo abaixo ao plasma é o creme leucocitário, contendo leucócitos que podem ser facilmente distinguidos dos eritrócitos da camada inferior. Um fator de enriquecimento de 10 é esperado a partir desse processo, portanto, devido a esse enriquecimento leucocitário ficar atento para evitar uma sobrecarga no processo de extração de DNA.



Fluido Cerebroespinal (CSF) e Medula Óssea

Os melhores resultados são obtidos de amostras frescas. As amostras podem ser armazenadas a 4°C por 2 a 3 horas. Para um período maior congelar as amostras a -20°C. É comum ocorrer o ressecamento das amostras. As amostras secas devem ser armazenadas em refrigerador a 4°C em ambiente livre de umidade.

Cartão Biopur

Certificar-se de que a amostra está completamente seca antes da armazenagem fornecendo tempo suficiente para o passo de secagem. Os cartões devem ser embalados individualmente em um envelope apropriado (impermeável a líquidos e gases, com vedação e proteção da luz), contendo 2-3 sachês indicativos de sílica para remover qualquer umidade residual. Certificar-se de que a mesma informação de identificação esteja presente no cartão e no envelope.

Os cartões embalados em envelopes podem ser armazenados em temperatura ambiente. Para armazenagem em longo prazo e melhor rendimento, armazene os cartões embalados em envelopes em geladeira ou freezer.

7. PROCEDIMENTO

O **BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus** abrange as seguintes etapas:

1. Lise da amostra;
2. Ligação do DNA genômico à membrana do tubo;
3. Lavagem da membrana e eliminação do etanol;
4. Eluição do DNA genômico.

Lise

Para um melhor resultado, as amostras devem estar em temperatura ambiente antes da lise. As amostras sofrem lise na presença de Tampão de Lise A e da Proteinase K em temperaturas elevadas.

Ligação do DNA Genômico

Pela adição do Tampão de Ligação B6 ao lisado, condições ótimas de ligação serão obtidas. Cada lisado é, então, transferido ao Tubo Spin RTA e o DNA genômico irá ligar-se à membrana. As condições ótimas de pH e salina garantem que contaminantes como proteínas, que podem inibir reações de PCR ou outras reações, não sejam retidas na membrana de sílica.

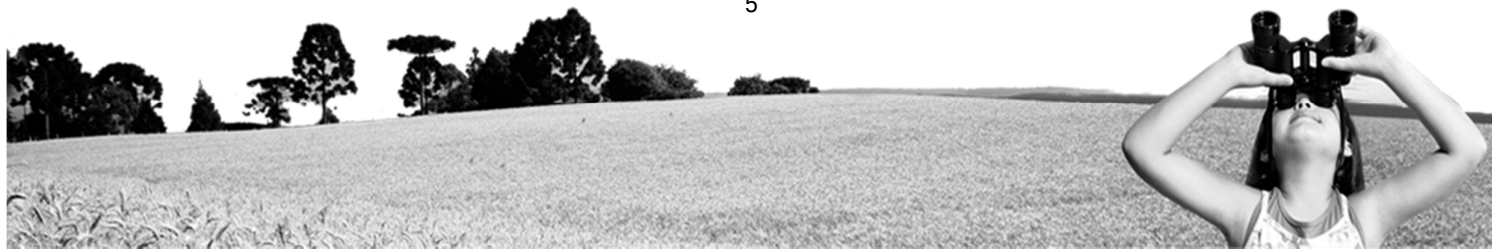
NOTA: DNA e RNA são purificados em paralelo se ambos estiverem presentes na amostra. Se um DNA genômico livre de RNA for necessário, recomenda-se adicionar 20 µL de solução estoque RNase A (20 mg/mL) à amostra antes da adição do Tampão de Ligação.

Remoção dos Contaminantes Residuais

Os contaminantes são eficazmente removidos usando Tampão de Lavagem I e II, enquanto o DNA genômico permanece ligado à membrana. Depois da lavagem a membrana deverá ser seca por centrifugação.

Eluição

O DNA genômico é eluído usando Tampão de Eluição e está pronto para uso em diferentes aplicações; pode ser armazenado entre 4 e 8°C por no mínimo 2 meses, ou até 5 anos se armazenado a -20°C.



8. EQUIPAMENTOS E REAGENTES NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Centrífuga para microtubos;
- Termomixer (56°C);
- Proveta (250 mL);
- Micropipetas monocanais e ponteiros com filtro;
- Vortex;
- Microtubos de 1,5 mL extras;
- Perfurador e suporte para recortar discos do cartão Biopur;
- Etanol P.A.;
- Água (ultrapura ou bidestilada ou de injeção);
- PBS 1X (opcional).

9. PREPARO DOS REAGENTES

Kit para 10 extrações (Amostra)

- Adicionar 500 µL de água (ultrapura, bidestilada ou de injeção) ao frasco de Proteinase K-Tipo D e misturar cuidadosamente;
- Adicionar 3 mL de etanol P.A. ao Tampão de Lavagem I. Misturar cuidadosamente e manter o frasco bem fechado;
- Adicionar 8,4 mL de etanol P.A. ao Tampão de Lavagem II. Misturar cuidadosamente e manter o frasco bem fechado.

Kit para 50 extrações

- Adicionar 1100 µL de água (ultrapura, bidestilada ou de injeção) ao frasco de Proteinase K-Tipo G e misturar cuidadosamente;
- Adicionar 15 mL de etanol P.A. ao Tampão de Lavagem I. Misturar cuidadosamente e manter o frasco bem fechado;
- Adicionar 35 mL de etanol P.A. ao Tampão de Lavagem II. Misturar cuidadosamente e manter o frasco bem fechado.

Kit para 250 extrações

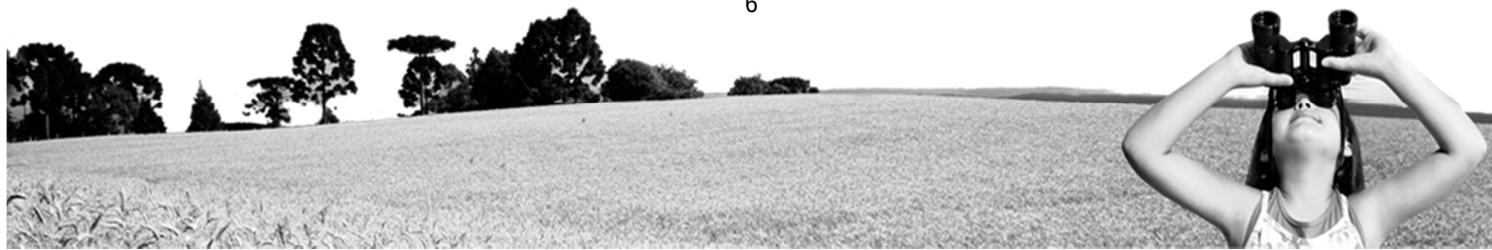
- Adicionar 1100 µL de água (ultrapura, bidestilada ou de injeção) ao frasco de Proteinase K-Tipo G e misturar cuidadosamente;
- Adicionar 65 mL de etanol P.A. ao Tampão de Lavagem I. Misturar cuidadosamente e manter o frasco bem fechado;
- Adicione 147 mL de etanol P.A. ao Tampão de Lavagem II. Misturar cuidadosamente e manter o frasco bem fechado.

10. PROTOCOLOS

As instruções a seguir são válidas para todos os protocolos.

Antes de iniciar o procedimento:

- Ligar o termomixer a 56°C;
- Aquecer a quantidade necessária do Tampão de Eluição a 56°C para o passo final de eluição;



- Identificar a quantidade necessária de Tubo Spin RTA – Amarelo (cada amostra: 1 unid.)
- Identificar a quantidade necessária de Tubo de Eluição 1,5 mL (cada amostra: 1 unid.)

NOTA: As velocidades de rotação (rpm) necessárias podem variar de uma marca de centrífuga para outra.

PROTOCOLO 1

- **Extração de DNA genômico de 200 µL de sangue total humano ou de mamífero**
- **Extração de DNA genômico de 30 µL de creme leucocitário (buffy coat)**

IMPORTANTE: Aliquotar a quantidade de Tampão de Eluição necessária para o número de amostras e colocar no termomixer a 56°C.

- 1) Transferir 200 µL de sangue total ou 30 µL de buffy coat dentro de um microtubo de 1,5 mL (não fornecido). Para amostras com volumes menores de 200 µL, completar o volume com PBS 1X ou água (ultrapura, bidestilada ou de injeção).
- 2) Adicionar 200 µL de Tampão de Lise A e 20 µL de Proteinase K. Homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva.
- 3) Incubar o microtubo de 1,5 mL por 15 minutos a 56°C, enquanto estiver em agitação contínua no termomixer.

Obs.: Caso não tenha um equipamento com agitação, homogeneizar a amostra cinco vezes no vortex durante a lise.

- 4) Adicionar 400 µL de Tampão de Ligação B6 e homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva. Transferir toda a mistura para o Tubo Spin RTA - Amarelo e incubar por 1 minuto.
- 5) Centrifugar por 2 minutos a 13.000 x g. Descartar o tubo inferior com o filtrado e colocar o tubo-filtro em um Tubo de Coleta RTA - Amarelo.
- 6) Adicionar 500 µL de Tampão de Lavagem I e centrifugar por 1 minuto a 13.000 x g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.
- 7) Adicionar 800 µL de Tampão de Lavagem II e centrifugar por 1 minuto a 13.000 x g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.
- 8) Centrifugar por 4 minutos na velocidade máxima para eliminar completamente o etanol.
- 9) Colocar o tubo-filtro em um Tubo de Eluição 1,5 mL devidamente identificado. Adicionar 200 µL de Tampão de Eluição pré-aquecido. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.

Obs.: Destacar a tampa do tubo-filtro antes da centrifugação e colocá-lo novamente no correspondente Tubo de Eluição 1,5 mL.

- 10) Centrifugar 8.000 x g por 1 minuto. Descartar o tubo-filtro e armazenar a amostra de DNA para futuros testes.

NOTA: O DNA pode também ser eluído com pouco (mas não menos que 30 µL) ou grande volume de Tampão de Eluição (dependendo do rendimento esperado ou concentração necessária do DNA).



PROTOCOLO 2

- **Extração de DNA genômico de 25 µL de sangue total de não mamíferos.**

IMPORTANTE: Aliquotar a quantidade de Tampão de Eluição necessária para o número de amostras e colocar no termomixer a 56°C.

- 1) Transferir 25 µL de sangue total dentro de um microtubo de 1,5 mL (não fornecido). Completar o volume para 200 µL com PBS 1X ou água (ultrapura, bidestilada ou de injeção).
- 2) Adicionar 200 µL de Tampão de Lise A e 20 µL de Proteinase K. Homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva.
- 3) Incubar o microtubo de 1,5 mL por 25 minutos a 56°C, enquanto estiver em agitação contínua no termomixer.

Obs.: Caso não tenha um equipamento com agitação, homogeneizar a amostra cinco vezes no vortex durante a lise.

- 4) Adicionar 400 µL de Tampão de Ligação B6 e homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva. Transferir toda a mistura para o Tubo Spin RTA - Amarelo e incubar por 1 minuto.
- 5) Centrifugar por 2 minutos a 13.000 x g. Descartar o tubo inferior com o filtrado e colocar o tubo-filtro em um Tubo de Coleta RTA - Amarelo.
- 6) Adicionar 500 µL de Tampão de Lavagem I e centrifugar por 1 minuto a 13.000g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.
- 7) Adicionar 800 µL de Tampão de Lavagem II e centrifugar por 1 minuto a 13.000g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.
- 8) Centrifugar por 4 minutos na velocidade máxima para eliminar completamente o etanol.
- 9) Colocar o tubo-filtro em um Tubo de Eluição 1,5 mL devidamente identificado. Adicionar 200 µL de Tampão de Eluição pré-aquecido. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.

Obs.: Destacar a tampa do tubo-filtro antes da centrifugação e colocá-lo novamente no correspondente Tubo de Eluição 1,5 mL.

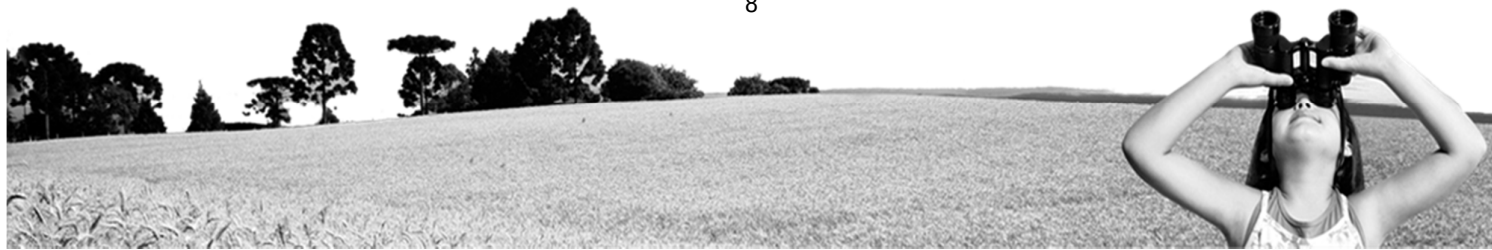
- 10) Centrifugar 8.000g por 1 minuto. Descartar o tubo-filtro e armazenar a amostra de DNA para futuros testes.

NOTA: O DNA pode também ser eluído com pouco (mas não menos que 30 µL) ou grande volume de Tampão de Eluição (dependendo do rendimento esperado ou concentração necessária do DNA).

PROTOCOLO 3

- **Extração de DNA genômico de 200 µL Fluido Cerebroespinal (CSF)**
- **Extração de DNA genômico de 20 µL de Medula Óssea.**
- **Extração de DNA genômico de pequenas quantidades de vários tipos de amostras humanas e de mamíferos.**

IMPORTANTE: Aliquotar a quantidade de Tampão de Eluição necessária para o número de amostras e colocar no termomixer a 56°C.



a. Material Fresco

Adicionar 200 μ L de fluido cerebroespinal ou 20 μ L de medula óssea em um microtubo de 1,5 mL (não fornecido). Para amostras com volumes menores de 200 μ L, completar o volume com PBS 1X ou água (ultrapura, bidestilada ou de injeção).

b. Material Seco

Tratar este material (por exemplo, lâminas hematológicas) como descrito a seguir:

- Umedecer o material seco com 1 gota de PBS 1X;
- Adicionar 180 μ L de PBS 1X a um microtubo de 1,5 mL (não fornecido);
- Raspar o material citológico dentro do microtubo usando o canto de uma lâmina limpa;
- Dissolver o raspado resultante por pipetagem repetitiva.

1) Adicionar 200 μ L de Tampão de Lise A e 20 μ L de Proteinase K. Homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva.

2) Incubar o microtubo de 1,5 mL por 20 minutos a 56°C, enquanto estiver em agitação contínua em um termomixer.

Obs.: Caso não tenha um equipamento com agitação, homogeneizar a amostra cinco vezes no vortex durante a lise.

3) Adicionar 400 μ L de Tampão de Ligação B6 e homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva. Transferir toda a mistura para o Tubo Spin RTA – Amarelo e incubar por 1 minuto.

4) Centrifugar por 2 minutos a 13.000 x g. Descartar o tubo inferior com o filtrado e colocar o tubo-filtro em um Tubo de Coleta RTA - Amarelo.

5) Adicionar 500 μ L de Tampão de Lavagem I e centrifugar por 1 minuto a 13.000 x g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.

6) Adicionar 800 μ L de Tampão de Lavagem II e centrifugar por 1 minuto a 13.000 x g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.

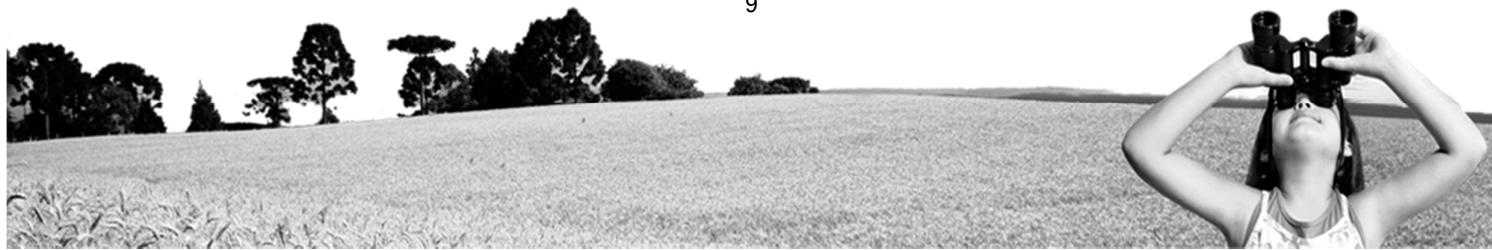
7) Centrifugar por 4 minutos na velocidade máxima para eliminar completamente o etanol.

8) Colocar o tubo-filtro em um Tubo de Eluição 1,5 mL devidamente identificado. Adicionar 200 μ L de Tampão de Eluição pré-aquecido. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;

Obs.: Destacar a tampa do tubo-filtro antes da centrifugação e colocá-lo novamente no correspondente Tubo de Eluição 1,5 mL.

9) Centrifugar 8.000 x g por 1 minuto. Descartar o tubo-filtro e armazenar a amostra de DNA para testes futuros.

NOTA: O DNA pode também ser eluído com pouco (mas não menos que 30 μ L) ou grande volume de Tampão de Eluição (dependendo do rendimento esperado ou concentração necessária do DNA).



PROTOCOLO 4

• Extração de DNA genômico a partir de sangue total aplicado no cartão Biopur

Seguir as recomendações abaixo para coleta de amostra utilizando o cartão Biopur.

- Utilizar luvas;
- Identificar o cartão com a informação apropriada. Não escrever na área delimitada para coleta;
- Manusear o cartão pelas extremidades para evitar contaminação cruzada. Não tocar nas áreas que serão utilizadas para coleta da amostra;

Para amostra de sangue total coletada com lanceta:

- Limpar a área a ser perfurada com antisséptico (lenços com álcool isopropil, swab com iodo ou algodão/gaze com álcool). A perfuração deve ser realizada com força suficiente para penetração da lanceta que sustente um fluxo de várias gotas de sangue. Utilizar uma lanceta estéril e descartável para perfurar a pele na lateral da extremidade do dedo. O procedimento de coleta deve fornecer pelo menos 200 µl de sangue total;
- Com o dedo estendido, permitir que uma grande gota se forme e se acumule no local da perfuração. Para coletar a gota, encostar o cartão na borda da gota, permitindo que o sangue seja absorvido pelo papel por capilaridade. Evitar que o dedo entre em contato com o cartão. Deixar outra gota de sangue se acumular e coletar na área ao lado da primeira coleta. Não acumular gotas de sangue uma sobre as outras. Continuar a coleta até preencher todos os círculos do cartão ou até que a perfuração se feche. Se a perfuração se fechar antes de coletar material suficiente, ela pode ser massageada levemente para encorajar a formação de nova gota de sangue. Não apertar a perfuração para obter mais sangue. Se a coleta for incompleta, este procedimento poderá ser repetido em um dedo adjacente;
- É importante que a coleta seja adequada, saturando cada círculo com sangue sem sobrepor gotas em uma mesma área;
- Fornecer um pedaço de algodão para cobrir a área perfurada;

Para amostra de sangue total coletada em tubo de coleta:

- Sangue venoso com anticoagulante (EDTA ou ACD) deve ser depositado no cartão o quanto antes após sua coleta, e preferencialmente em 24 horas após a coleta. Para amostras recém-coletadas, inverter o tubo de coleta 2-3 vezes para homogeneizar o sangue total. Abrir cuidadosamente o tubo de coleta;
- Utilizar uma micropipeta com ponteira descartável para aspirar 15 µl do sangue total, sem encostar a ponteira no cartão, dispensando a amostra no círculo; repetir a aplicação em área adjacente até completar a área completamente, sem sobrepor a amostra (5-6 aplicações de 15 µl). Alternativamente, utilizar uma pipeta Pasteur ou um meio de transferência apropriado, limpo e estéril para saturar a área do cartão sem sobrepor a amostra.

Secagem do cartão com amostra de sangue:

O tempo para secagem da amostra irá depender da temperatura ambiente e das condições de umidade. Em geral, recomenda-se secar todas as amostras por pelo menos 4 horas (preferencialmente durante a noite) em posição suspensa horizontal (em um rack de secagem, se disponível), ou na horizontal sob um papel toalha limpo em fluxo laminar ou capela. Não utilizar nenhuma fonte externa de calor para secar a amostra. Quando seca, a amostra coletada terá um aspecto marrom uniforme, e nenhuma área com coloração avermelhada deve ser observada.



Considerações importantes: na presença de umidade, os ácidos nucleicos nas amostras aplicadas no cartão são extremamente sensíveis à degradação, sendo essencial se assegurar de que as amostras estejam completamente secas e com sachê dessecante com indicador de umidade. Ao abrir envelopes armazenados sob refrigeração ou congelamento, é importante equilibrar o envelope em temperatura ambiente antes de abri-lo. Abrir envelopes imediatamente após sua retirada de baixas temperaturas poderá resultar na condensação das amostras no interior do envelope.

Assegurar-se que os dissecantes não contêm umidade e que permaneceram secos durante sua armazenagem. Eles podem ser secos e/ou reutilizados em estufa a 65°C overnight. Retirar da estufa e armazenar em uma embalagem selada.

Os envelopes devem ser próprios para armazenagem de amostras biológicas, impermeáveis a gases.

IMPORTANTE: Aliquotar a quantidade de Tampão de Eluição necessária para o número de amostras e colocar no termomixer a 56°C.

1) Recortar com perfurador sobre suporte apropriado de 2 a 4 discos de 2.0 mm cada em um microtubo de 1,5 mL (não fornecido). Recortar 2 discos do papel em branco entre amostras diferentes.

2) Adicionar 200 µL de Tampão de Lise A e 20 µL de Proteinase K. Homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva.

3) Incubar o microtubo de 1,5 mL por 30 minutos a 56°C, enquanto estiver em agitação contínua em um termomixer.

Obs.: Caso não tenha um equipamento com agitação, homogeneizar a amostra cinco vezes no vortex durante a lise.

4) Homogeneizar no vortex por 1 minuto, espremer/macerar os discos com uma ponteira.

5) Centrifugar a 13.000 x g por 1 minuto e transferir o sobrenadante para novo microtubo de 1,5 mL (não fornecido) e descartar os discos.

6) Adicionar 400 µL de Tampão de Ligação B6 e homogeneizar a amostra no vortex ou por pipetagem repetitiva. Transferir toda a mistura para o Tubo Spin RTA – Amarelo e incubar por 1 minuto;

7) Centrifugar por 2 minutos a 13.000 x g. Descartar o tubo inferior com o filtrado e colocar o tubo-filtro em um Tubo de Coleta RTA - Amarelo.

8) Adicionar 500 µL de Tampão de Lavagem I e centrifugar por 1 minuto a 13.000 x g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.

9) Adicionar 800 µL de Tampão de Lavagem II e centrifugar por 1 minuto a 13.000 x g. Descartar o filtrado e colocar o tubo-filtro no mesmo Tubo de Coleta RTA - Amarelo.

10) Centrifugar por 4 minutos na velocidade máxima para eliminar completamente o etanol.

11) Colocar o tubo-filtro em um Tubo de Eluição 1,5 mL devidamente identificado. Adicionar 50/100 µL (para 2 ou 4 discos respectivamente) de Tampão de Eluição pré-aquecido. Incubar em temperatura ambiente por 1 minuto.

Obs.: Destacar a tampa do tubo-filtro antes da centrifugação e colocá-lo novamente no correspondente Tubo de Eluição 1,5 mL.



12) Centrifugar 8.000 x g por 1 minuto. Descartar o tubo-filtro e armazenar a amostra de DNA para testes futuros.

NOTA: O DNA pode também ser eluído com pouco (mas não menos que 30 µL) ou grande volume de Tampão de Eluição (dependendo do rendimento esperado ou concentração necessária do DNA).

11. CONTROLE DE QUALIDADE

O fabricante e o distribuidor garantem a função correta do **BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus** para as aplicações descritas neste manual, assegurando um produto de qualidade consistente.

12. INFORMAÇÕES PARA PEDIDO

PRODUTO	TAMANHO DA EMBALAGEM	CÓDIGO DO PRODUTO
BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus – 50	50 testes	BP100-50
BIOPUR Kit Extração Mini Spin Plus – 250	250 testes	BP101-250

13. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

SR Comércio de Produtos para Laboratórios Ltda - EPP
 Rua Paraíso do Norte, 866 - CEP: 83.324-221 – Pinhais - PR
 CNPJ: 04.645.160/0001-49
Responsável Técnica: Franciele Camila Kimura - CRF/PR: 19247

14. DISTRIBUIDOR

Biometrix Diagnóstica Ltda.
 Rua Estrada da Graciosa, 1081, Curitiba – Paraná – Brasil - CEP: 82.840-360
 Tel.: (41) 2108-5250
 Fax: (41) 2108-5252
 DDG: 0800 726 0504
 E-mail: biometrix@biometrix.com.br
 Site: www.biometrix.com.br
 CNPJ: 06.145.976/0001-39
Responsável Técnica: Flávia Stival – CRF/PR: 26565

Aprovação:

25/06/2014

X 

Rafaela Wassmansdorf
 Laboratório
 Assinado por: rwassmansdorf

