

KIT DE EXTRAÇÃO MINI VAC AUTOMAÇÃO DE 96 AMOSTRAS

Instruções de Uso

1. USO PRETENDIDO

O BIOPUR Kit de Extração Mini VAC Automação 96 Amostras é a ferramenta ideal para extração automática rápida e confiável de DNA genômico, empregando placa filtro de 96 poços e o Equipamento Biomotion. 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 humano;
- Sangue total de mamíferos;
- Creme leucocitário (buffy coat);
- Fluido cerebrospinal (CFS);
- Sangue de não mamíferos, tais como aves e peixes;
- Medula óssea.

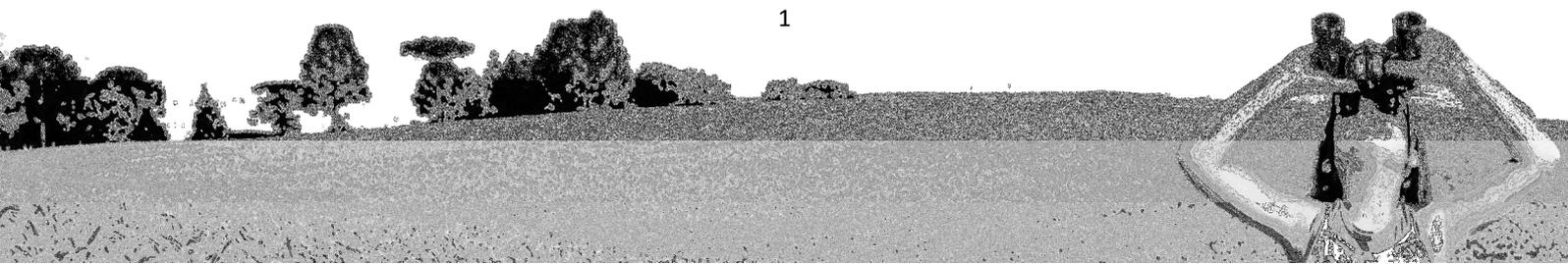
Não existe estudo de validação publicado para a extração de DNA genômico de células isoladas ou oriundas de cultura, tecidos, swabs, manchas secas de sangue ou fluidos corpóreos livres de células, como fluido sinovial e urina, fezes, e de bactérias, fungos, parasitas ou purificação de RNA total. A aplicação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

O BIOPUR Kit de Extração Mini VAC Automação de 96 amostras é designado para o processamento de múltiplas amostras simultaneamente. O procedimento é realizado em plataforma automatizada, necessitando assim, mínima interação com o usuário; além disso, não requer uma extração com fenol e clorofórmio ou precipitação em etanol. 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;
- Análise RFLP;
- Digestão por enzima de restrição;
- Hibridização;
- Análises SNP;
- Genotipagem.

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 humanos; 1 - 100 µL de sangue total de outros mamíferos; 1 - 200 µL de fluido cerebrospinal; 1 - 30 µL creme leucocitário (buffy coat); 1 - 25 µL sangue de não mamíferos; 1 - 20 µL de medula óssea.	2 - 10 µg, dependendo da qualidade, origem e idade da amostra, seu transporte e armazenamento.	70 minutos	A260/A280: 1,7-2,0

A quantidade de DNA purificado obtido pelo **BIOPUR Kit de Extração Mini VAC Automação 96** amostras depende do tipo de amostra e do número de células presentes 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 2 a 8 µg de DNA. Se uma amostra de sangue total é 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.

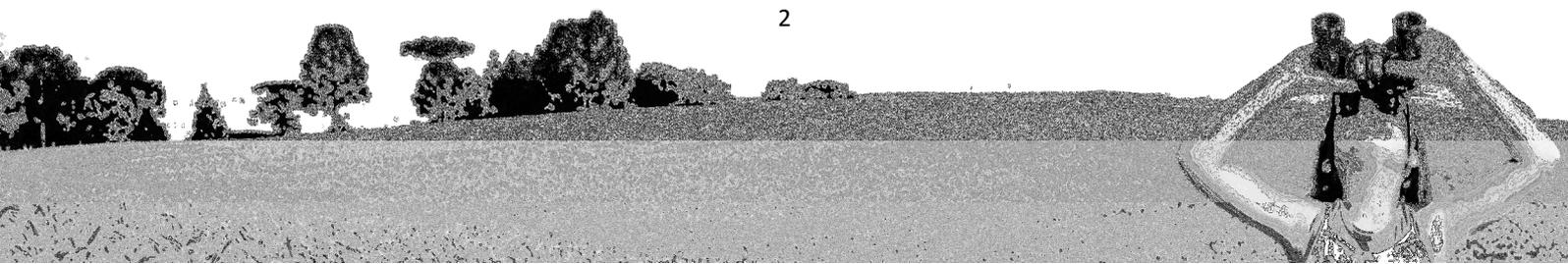
Para a maioria das amostras de sangue total, uma única eluição com 200 µL de Tampão de Eluição é o suficiente. Para amostras com elevada concentração de células brancas, aproximadamente 80% do DNA será eluído nos primeiros 200 µL e os outros 20% na eluição seguinte de 200 µL.

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	1 x 96 (Amostra)	4 x 96	12 x 96
Código do Produto	BP102-96	BP103-384	BP104-1152
Tampão de Lise	25 mL	100 mL	265 mL
Proteinase K*	5 x 1,05 mL* solução de trabalho	18 mL* solução de trabalho	1 x 54 mL* solução de trabalho
Tampão de Ligação	25 mL	100 mL	265 mL
Tampão de Lavagem I*	50 mL* (volume final 100 mL)	2 x 80 mL* (volume final 2 x 160 mL)	3 x 180 mL* (volume final 3 x 360 mL)
Tampão de Lavagem II*	30 mL* (volume final 100 mL)	2 x 60 mL* (volume final 2 x 200 mL)	3 x 105 mL* (volume final 3 x 355 mL)
Tampão de Eluição M	25 mL	100 mL	265 mL
Placa de Ligação de DNA Tipo B	1 unid.	4 unid.	12 unid.
Placa de Coleta de 2 mL	1 unid.	4 unid.	12 unid.
Placa de Eluição 1,2 mL	1 unid.	4 unid.	12 unid.
Filme Plástico Adesivo	2 unid.	8 unid.	24 unid.
Manual de Instruções	1 unid.	1 unid.	1 unid.

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



4. ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES

Todos os tampões e componentes do **BIOPUR Kit de Extração Mini VAC Automação 96 Amostras** exceto a Proteínase k devem ser armazenadas em temperatura ambiente entre 15° e 30°C e são estáveis por até 18 meses nessas condições.

Proteinase K

A Proteínase K liofilizada deve ser armazenada em geladeira entre 2° e 8°C. A Proteínase K reconstituída deve ser armazenada a -20°C; recomenda-se dividir a solução em alíquotas para o armazenamento no freezer. Congelamentos e descongelamentos repetidos devem ser evitados. 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, dissolvê-lo com cuidadoso aquecimento (até 30°C).

5. INFORMAÇÃO 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 ao descartá-los 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.

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

Evitar contaminação microbiana dos reagentes do kit.

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

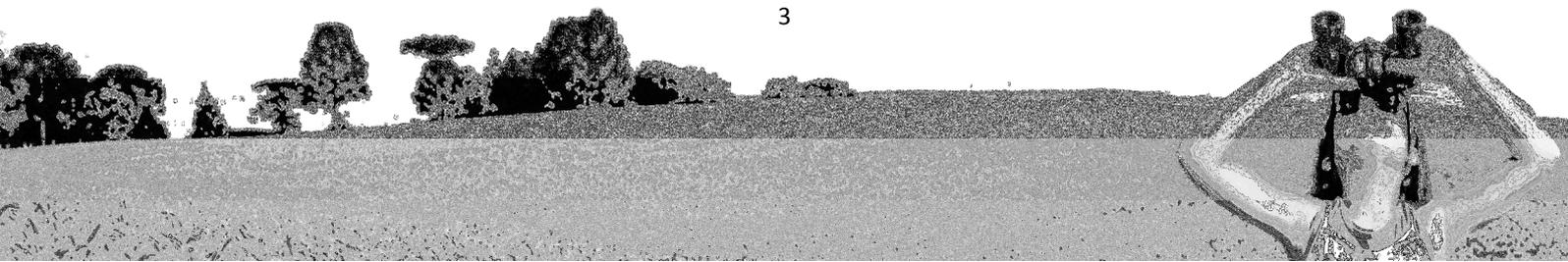
Este kit deve ser usado apenas por pessoal treinado.

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 necessite de 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 de Extração Mini VAC Automação 96 amostras**:

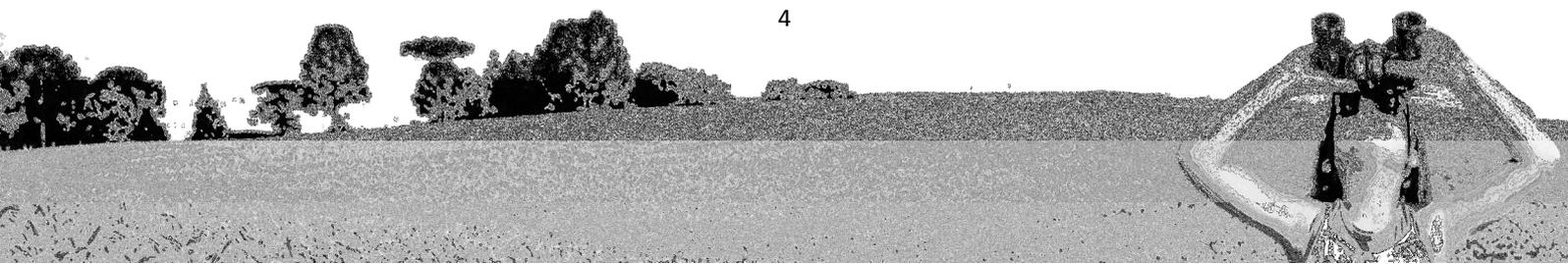


PRODUTO	RISCOS
Tampão de Lise	R36, S2/24
Tampão de Ligação	R11/22/41/67, S16/24/25/26
Proteinase K	R36/37/38/42, S2/22/24/26/36/37
Tampão de Lavagem I	R20/21/22/32/52/53, S2/13/61
LEGENDA DE RISCOS	
R11	Altamente inflamável.
R20/21/22	Nocivo por inalação, contato com a pele e se ingerido.
R32	Contato com gases muito tóxicos liberados de ácidos.
R36	Irritante para os olhos.
R36/37/38	Irritante para os olhos, sistema respiratório e pele.
R41	Risco sério de danos aos olhos.
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	Mante 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.
S24	Evitar contato com a pele.
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 utilizando amostras frescas. Amostras de sangue total (conservadas com EDTA e citrato) podem ser estocadas em temperatura ambiente por 2 a 3 horas; para uma armazenagem rápida (até 24 horas) as amostras devem ser estocadas a 4°C. Para longo período de estocagem, é recomendado congelamento das amostras entre -20° e -80°C. Congelamentos 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 na pipetagem, pois eles poderão entupir a membrana da Placa de Ligação de DNA Tipo C. 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 (buffy coat) é a fração de sangue 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, citrato, mas não heparina) 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.

7. PROCEDIMENTO

O procedimento do **Biopur Kit de Extração Mini VAC Automação 96 amostras** abrange as seguintes etapas:

1. Lise da amostra;
2. Ligação do DNA genômico à membrana da Placa de Ligação;
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 são lisadas em condições de desnaturação em temperaturas elevadas na presença do Tampão de Lise e Proteinase K no Equipamento Biomotion.

Ligação de DNA genômico

Pela adição do Tampão de Ligação ao lisado, as condições ótimas de ligação serão obtidas. Amostras serão transferidas para Placa de Ligação de DNA B e o DNA genômico ligar-se-á à membrana. As condições ótimas de pH e salinas da mistura asseguram que contaminantes (como as proteínas, que podem inibir PCR ou outras reações diversas) não sejam retidos na membrana de sílica.

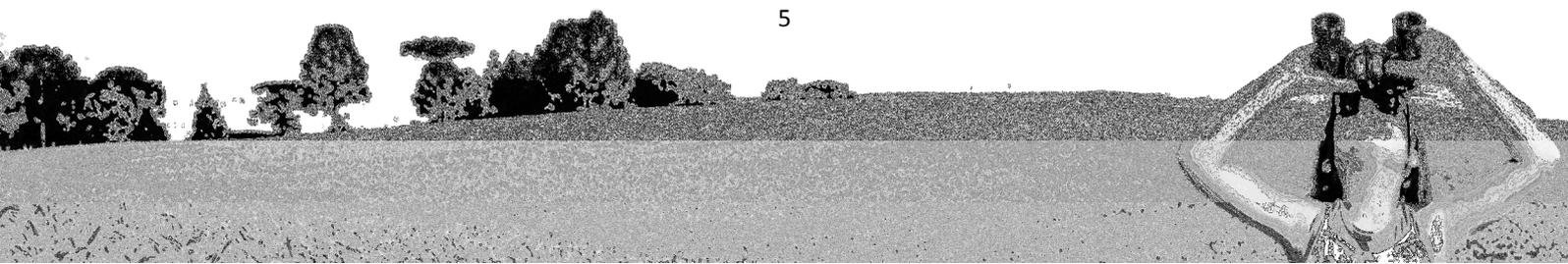
NOTA: DNA e RNA são purificados em paralelo se ambos estiverem presentes na amostra fresca. Se for necessário DNA genômico livre de RNA, a adição de 20µL de solução estoque RNase A (20mg/mL) na amostra antes de adicionar Tampão de Ligação é recomendada.

Remoção dos Contaminantes Residuais

Os contaminantes são eficientemente removidos usando Tampão de Lavagem I e II e depois a membrana será seca por contínuo vácuo.

Eluição do DNA genômico

O DNA genômico é eluído utilizando Tampão de Eluição M. O DNA eluído está pronto para uso em diferentes aplicações em Biologia Molecular e 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

- Proveta (250 mL)
- Micropipeta monocal e ponteiras com filtro
- Etanol PA
- Água (ultrapura ou bidestilada ou de injeção)
- PBS 1X (opcional)

9. PREPARO DOS REAGENTES

Kit 1x96 (Amostra)

- Adicionar 1050 µL de água (ultrapura, bidestilada ou de injeção) ao frasco da Proteinase K, e misturar cuidadosamente;
- Adicionar 50 mL de etanol PA ao Tampão de Lavagem I. Misturar cuidadosamente e manter recipiente bem fechado;
- Adicionar 70 mL etanol PA ao Tampão de Lavagem II. Misturar cuidadosamente e manter o recipiente bem fechado.

Kit 4x96

- Adicionar 18 mL de água (ultrapura, bidestilada ou de injeção) ao frasco da Proteinase K, e misturar cuidadosamente;
- Adicionar 80 mL de etanol PA ao Tampão de Lavagem I. Misturar cuidadosamente e manter o recipiente bem fechado;
- Adicionar 140 mL etanol PA ao Tampão de Lavagem II. Misturar cuidadosamente e manter o recipiente bem fechado.

Kit 12x96

- Adicionar 54 mL de água (ultrapura, bidestilada ou de injeção) ao frasco da Proteinase K, e misturar cuidadosamente;
- Adicionar 180 mL de etanol PA ao Tampão de Lavagem I. Misturar cuidadosamente e manter recipiente bem fechado;
- Adicionar 250 mL etanol PA ao Tampão de Lavagem II. Misturar cuidadosamente e manter o recipiente bem fechado.

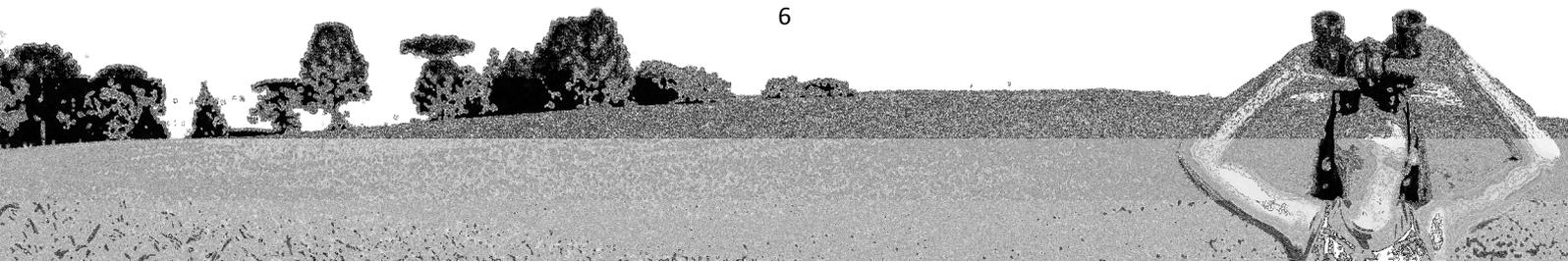
10. PROTOCOLOS

Antes de iniciar o procedimento:

- 1) Ligar o equipamento Biomotion;
- 2) Selecionar o protocolo e iniciar o método;
- 3) Selecionar o número de amostra que serão extraídas, começando sempre com a primeira coluna;
- 4) Uma vez que as colunas requeridas foram selecionadas, colocar todos os materiais necessários na mesa de trabalho, como mostrado no painel de controle;
- 5) Preencher os tampões nos reservatórios como descritos no painel de controle;
- 6) Se todos os tampões, placas, ponteiras e amostras estiverem colocados em suas posições corretamente, como descrito no software, pressionar “START” no painel do Biomotion, e o protocolo será executado.

IMPORTANTE:

- Colocar todos os reagentes em temperatura ambiente. Quando necessário, misturar delicadamente e



dissolver novamente quaisquer precipitações aquecendo a 30°C até a dissolução. Mexer gentilmente para evitar formação de espuma.

- Certificar-se que as ponteiras estão carregadas e que as tampas dos racks estão abertas.
- Não dispensar os volumes necessários de reagentes nos tubos de reagentes até o exato momento de começar um ensaio.
- Manter os reagentes cobertos com as tampas fornecidas. Deixar os reagentes nos tubos por períodos prolongados resultará em evaporação (especialmente soluções com álcool) e formação de precipitações de sal, resultando em perda de condições de ligação. Por esta razão, reagentes preparados muito antes do ensaio devem ser descartados, e deve ser carregado na plataforma um tubo novo e limpo, com reagentes frescos.
- Amostras sempre devem ser processadas em lotes de 8 colunas completas. Se não for utilizar todos os poços em uma coluna, certificar-se de que os poços não usados contêm líquido substituto (tais como água ou tampão) em volume igual ao volume das amostras.
- Se houver menos de 96 amostras para extrair será necessário cobrir a porção não usada da Placa de Ligação de DNA Tipo B com um pedaço de filme plástico. Cobrir a porção não usada é essencial para uma apropriada operação de vácuo. Não reutilizar a porção não utilizada da placa. O manuseio repetido da placa pode resultar em contaminação cruzada nas extrações futuras.

PROTOCOLO 1

- Extração de DNA genômico de 200 µL de sangue total humano
 - Extração de DNA genômico de 100 µL sangue total de outros mamíferos
 - Extração de DNA genômico de 30 µL de creme leucocitário (buffy coat)
- 1) Transferir 200 µL de sangue total humano ou 100 µL sangue total de outros mamíferos ou 30 µL de buffy coat a cada poço da Placa de Coleta de 2 mL. Para amostras que tenham volume menor que 200 µL, completar o volume com PBS 1X ou água (ultrapura, bidestilada ou de injeção).

IMPORTANTE: Homogeneizar a Placa de Coleta 2 mL (selada cuidadosamente) no vortex. Uma agitação incompleta reduzirá a qualidade e rendimento do DNA extraído.

- 2) Colocar a Placa de Coleta de 2 mL na posição da placa de amostras na plataforma do Biomotion e iniciar o procedimento conforme instruções do equipamento.

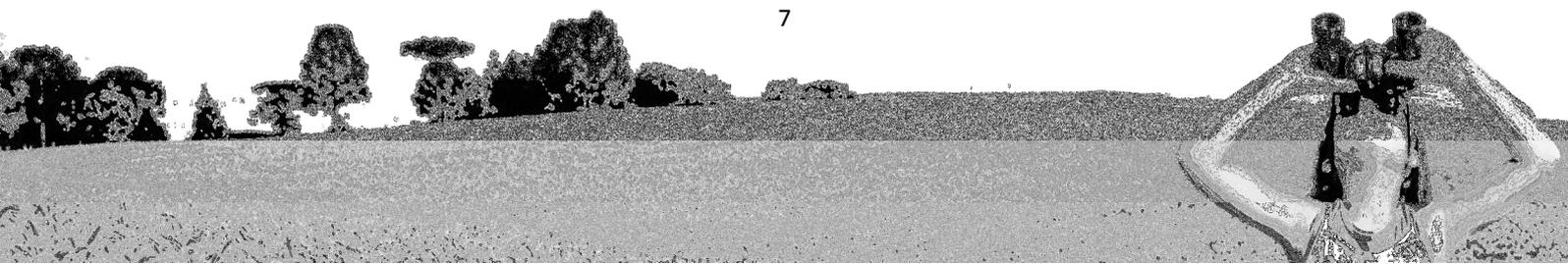
PROTOCOLO 2

- Extração de DNA genômico de 25 µL de sangue de não mamífero
- 1) Transferir 25 µL de sangue total de não mamífero para cada poço da Placa de Coleta de 2 mL. Completar o volume para 200 µL com Tampão PBS 1X ou água (ultrapura, bidestilada ou de injeção).

IMPORTANTE: Homogeneizar a Placa de Coleta 2 mL (selada cuidadosamente) no vortex. Uma agitação incompleta reduzirá a qualidade e rendimento do DNA extraído.

- 3) Colocar a Placa de Coleta de 2 mL na posição da placa de amostras na plataforma do Biomotion e iniciar o procedimento, conforme instruções do equipamento.

No final do procedimento, armazenar a Placa de Eluição 1,2 mL com as amostras de DNA para futuros testes.



PROTOCOLO 3

- Extração de DNA genômico de 200 μ L de fluido cerebrospinal (CFS)
- Extração de DNA genômico de 20 μ L medula óssea

A) Adicionar material fresco

- 1) Transferir 200 μ L de fluido cerebrospinal ou 20 μ L de medula óssea para cada poço da Placa de Coleta de 2 mL. Completar o volume até 200 μ L com PBS 1X ou água (ultrapura, bidestilada ou de injeção);
- 2) Colocar a Placa de Coleta de 2 mL na posição da placa de amostras na plataforma do Biomotion e iniciar o procedimento, conforme instruções do equipamento.

B) Tratar material desidratado (por exemplo: lâmina hematológica) como segue:

- 1) Umidificar o material desidratado com uma gota de PBS 1X;
- 2) Adicionar 180 μ L de PBS 1X em um microtubo de 1,5 mL (não fornecido);
- 3) Raspar material citológico no microtubo utilizando a borda de uma lâmina limpa;
- 4) Dissolver o resíduo resultante por pipetagem repetitiva;
- 5) Transferir o material dissolvido em um poço da Placa de Coleta de 2 mL;
- 6) Completar com PBS 1X ou água (ultrapura, bidestilada ou de injeção) o volume até 200 μ L;
- 7) Colocar a Placa de Coleta de 2 mL na posição da placa de amostras na plataforma do Biomotion e iniciar o procedimento conforme instruções do equipamento.

No final do procedimento, armazenar a Placa de Eluição 1,2 mL com as amostras de DNA para futuros testes.

Limpeza Pós-Ensaio

Materiais plásticos descartáveis e resíduos de líquidos:

- 1) Descartar materiais plásticos e resíduos de líquidos de acordo com as instruções do laboratório por tipo de amostras e risco de reagente.
- 2) Não adicionar alvejante ou soluções ácidas diretamente nas soluções que contenham guanidina (Tampão de Lise e Tampão de Lavagem I) ou resíduo de extração. A guanidina produz compostos reativos e gases tóxicos quando misturada com alvejantes ou ácidos. Para qualquer item contaminado com esses tampões, limpar com detergente e água para remover todos os traços de guanidina antes da limpeza com alvejante ou soluções ácidas.

Partes não descartáveis (Caixa de descarte de ponteiros, Reservatório de resíduo, Vac-Frame 1 do Biomotion):

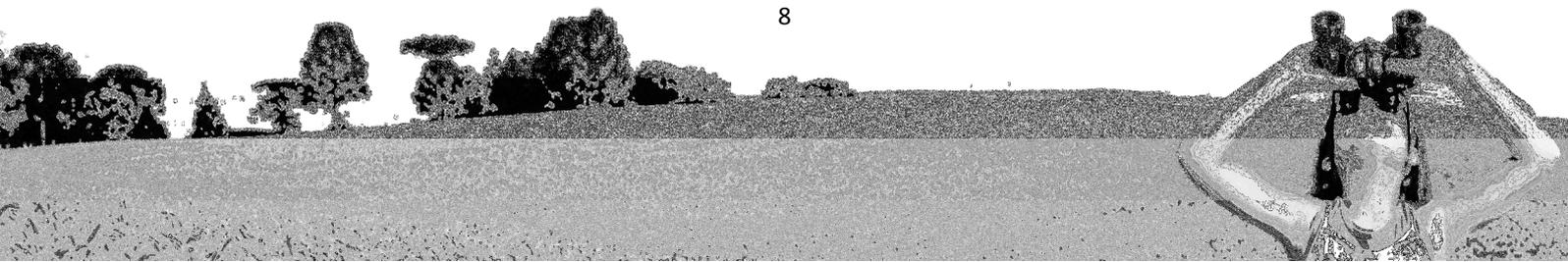
- 1) Enxaguar totalmente com água fria e corrente e deixar secar.
- 2) As partes reutilizáveis devem ser lavadas assegurando que elas estejam livres de RNA/DNA e RNase/DNase. Tenha certeza que elas estejam secas antes de reutilizar.
- 3) Se uma limpeza futura for necessária: enxaguar com água corrente para remover o sal, deixar secar e limpar com solução de hipoclorito de sódio de 1% (concentração final do alvejante) por mais 30 minutos. Enxaguar totalmente com bastante com água livre de RNase em grau de Biologia Molecular ou miliQ e deixar secar.

Ou

- 4) Lavar por 1 minuto em NaOH 0,1M, EDTA 1mM seguindo por 1 minuto de lavagem em HCl 0,4M, então enxaguar abundantemente com água livre de RNase em grau de Biologia Molecular ou miliQ

IMPORTANTE:

Não autoclavar ou esterilizar por calor as partes reutilizáveis (reservatório Biomotion 400mL, Vac-Frame 1 e Biomotion e Caixa de descarte de ponteiros). Não exceder 100°C.



11. CONTROLE DE QUALIDADE

O fabricante e o distribuidor garantem a função correta do **BIOPUR Kit de Extração Mini VAC Automação 96 amostras** para as aplicações conforme descritas neste manual, assegurando um produto de consistente qualidade.

12. INFORMAÇÕES PARA PEDIDO

PRODUTO	TAMANHO DA EMBALAGEM	CÓDIGO DO PRODUTO
BIOPUR Kit de Extração Mini VAC Automação 96 amostras - 4X96	384 extrações	BP103-384
BIOPUR Kit de Extração Mini VAC Automação 96 amostras - 12X96	1152 extrações	BP104-1152

13. INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

SR Comércio de Produtos para Laboratórios Ltda. - EPP
 Rua Paraíso do Norte, 866 - CEP: 83.324-221 - Pinhais - PR
 Tel.: (41) 2108-5295
 Fax: (41) 3667-2660
 E-mail: assessoriacientifica@srprodulab.com.br
 Site: www.srprodulab.com.br
 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: Edna Cristina Kurokawa Guimarães Ferreira - CRQ/PR: 09302336

Aprovação:
 08/10/2013

X 

Rafaela Wassmansdorf
 Laboratório
 Assinado por: Rafaela Wassmansdorf

