

Instruções de Uso

Kit de Extração de DNA/RNA

SAMPLE FLEX *pht*

Rev.: 12/11/2024
Código: K2

ÍNDICE

ÍNDICE	2
1- Finalidade do Kit	3
2- Princípio de ação	3
3- Apresentação comercial	3
4- Reagentes e insumos	4
5- Materiais necessários, não fornecidos no Kit	4
6- Condições de armazenamento e transporte	4
7- Amostras	4
8- Cuidados especiais	4
9- Medidas de segurança	5
10- Preparo dos reagentes (reconstituição)	5
11- Protocolo para extração de DNA/RNA de tecidos	6
12- Preparo das amostras de sangue	7
13- Protocolo para extração de DNA/RNA de sangue ou fluidos corporais ricos em matéria orgânica	8
14- Protocolo para extração VIRAL e/ou fluidos corporais pobres em matéria orgânica	9
15- Limitações	10
16- Referência bibliográfica	10
17- Atendimento ao consumidor	11
18- Simbologia utilizada nos rótulos	11

1- Finalidade do Kit

O **Kit de Extração de DNA/RNA - SAMPLE FLEX pht** é um produto desenvolvido para o isolamento e purificação *in vitro* de DNA/RNA de vírus, tecidos mortos, tecidos vivos, tecidos congelados, tecidos cartilagosos, sangue, sangue total, fluidos corporais, saliva, pelos, amostras em *swab*, cultura de células, além de bactérias e vírus presentes nas amostras. Os ácidos nucleicos obtidos podem ser utilizados para variadas aplicações como PCR, RT-PCR, qPCR, RT-qPCR e sequenciamento.

Dependendo do tipo de amostra, os protocolos para extração de DNA/RNA podem variar. Consulte o quadro abaixo para selecionar o protocolo mais adequado à sua necessidade:

Amostra	Protocolo - item 11	Protocolo - item 13	Protocolo - item 14
Tecido animal	✓		
Tecido muscular	✓		
Tecidos mortos	✓		
Tecidos vivos	✓		
Tecido cartilaginoso	✓		
Tecido fixado em etanol	✓		
Pelo	✓		
Sangue		✓	
Sangue total		✓	
Sangue seco		✓	
Cultura de células		✓	
Fluidos corporais (ricos em matéria orgânica)		✓	
Fluidos corporais (pobres em matéria orgânica)			✓
Vírus			✓
Saliva			✓
Amostra em <i>swab</i>			✓
OUTRAS AMOSTRAS	Este Kit pode ser utilizado para outras amostras, não citadas acima. Em caso de dúvidas, entre em contato com o nosso setor técnico através do e-mail pht@phoneutria.com.br ou pelo telefone (31) 99585-3050 / (31) 3427-6413.		

2- Princípio de ação

O **Kit de Extração de DNA/RNA - SAMPLE FLEX pht** propicia a lise do material biológico, liberando os ácidos nucleicos, seguida pela purificação do DNA/RNA por meio de colunas de sílica. O processo resulta em ácidos nucleicos concentrados e puros, adequados para diversas aplicações, como técnicas de biologia molecular, diagnóstico molecular e sequenciamento.

3- Apresentação comercial

- Kit para 50 extrações (código: K2-50);
- Kit para 250 extrações (código: K2-250).

4- Reagentes e insumos

O **Kit de Extração de DNA/RNA - SAMPLE FLEX *pht*** é composto por:

Reagentes/Insumos	Quantidade por Kit	
	50 extrações	250 extrações
Proteinase K (cód. Z4)	1 frasco	1 frasco
Tampão ALR-PK (cód. K0.0)	1 frasco	1 frasco
Solução de Lise (cód. K0.1)	1 frasco	1 frasco
Etanol (cód. K0.2)	1 frasco	1 frasco
Solução A (cód. K0.3)	1 frasco	1 frasco
Solução B (cód. K0.4)	1 frasco	1 frasco
Tampão de Eluição (cód. K0.5)	2 frascos	1 frasco
Tampão de Reconstituição (cód. K0.6)	1 frasco	1 frasco
Carreador (cód. C1)	1 frasco	1 frasco
Tubo de Lise (cód. K0.7)	50 unid	250 unid
Coluna de Sílica com Tubo Coletor (cód. K0.8)	50 unid	250 unid
Tubo Coletor (cód. K0.9)	100 unid	500 unid

5- Materiais necessários, não fornecidos no Kit

- Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL);
- Capela de fluxo laminar;
- Microtubo de 1,5 mL ou 2 mL, com tampa, para eluir o DNA/RNA da coluna;
- Microcentrífuga;
- Agitador vórtex;
- Banho-maria;
- Equipamento de Proteção Individual (como jaleco, máscara, touca, luvas e óculos).

6- Condições de armazenamento e transporte

Todos os reagentes e insumos podem ser transportados e armazenados à temperatura ambiente, entre 15 °C e 30 °C. Manter ao abrigo da luz e umidade.

Após reconstituição, recomenda-se armazenar a Proteinase K e o Carreador à -20°C.

7- Amostras

O **Kit de Extração de DNA/RNA - SAMPLE FLEX *pht*** pode ser utilizado para vírus, tecidos mortos, tecidos vivos, tecidos congelados, tecidos cartilaginosos, sangue, sangue total, fluidos corporais, saliva, pelos, amostras em *swab*, cultura de células, além de bactérias e vírus presentes nas amostras. Consulte-nos sobre a possibilidade de extração de DNA/RNA de outras amostras.

8- Cuidados especiais

Não utilize o produto em caso de danos na embalagem e/ou com a validade expirada;

A manipulação de qualquer etapa deste Kit deve ser realizada por especialistas devidamente treinados;

Para a obtenção de resultados precisos, siga com rigor a metodologia proposta;

O desempenho do Kit está diretamente relacionado aos equipamentos e instrumentos utilizados, os quais devem estar devidamente calibrados e em boas condições de uso;

Orientar-se pelas normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental para que o descarte dos reagentes e do material biológico seja feito de acordo com a legislação vigente;

Atente-se ao manusear amostras biológicas, para evitar contaminação das soluções do Kit. Caso ocorra contaminação, os resultados serão imprecisos e inapropriados;

Disponha de áreas separadas para a extração e preparação das amostras;

Não congele os reagentes do kit (exceto Proteinase K e Carreador reconstituídos) e evite ao máximo o congelamento e o descongelamento constantes das suas amostras.

9- Medidas de segurança

Para a manipulação do **Kit de Extração de DNA/RNA - SAMPLE FLEX pht** será necessário o uso dos seguintes EPIs (não fornecidos no Kit): jaleco, máscara, touca, luvas e óculos de proteção.

Evite contato com a pele e mucosas. Não inale os reagentes liofilizados. Manuseie os reagentes longe de fontes de ignição. Em caso de acidente, procure cuidados médicos imediatamente. Os reagentes que compõem este Kit podem ser inflamáveis; perigosos se ingeridos; irritante aos olhos, sistema respiratório e pele; causar sensibilização por inalação; enjoos e tonturas pela inalação dos vapores.

Para informações sobre biossegurança e orientações em casos de acidentes com o produto, consulte a Ficha de Dados de Segurança (FDS), disponível por meio do Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC) da Phoneutria Biotecnologia e Serviços. O contato pode ser feito pelo e-mail **pht@phoneutria.com.br** ou pelos telefones **(31) 99585-3050** e **(31) 3427-6413**.

10- Preparo dos reagentes (reconstituição)

Reconstituição da Proteinase K	
Variação	Volume do Tampão de Reconstituição
50 reações	210 µL
250 reações	1050 µL
Reconstituição do Carreador	
Variação	Volume do Tampão de Reconstituição
50 reações	110 µL
250 reações	550 µL
Recomendações para a reconstituição da Proteinase K e do Carreador: 1) Centrifugue os tubos de Proteinase K e de Carreador por 5 segundos a 10.000 rpm; 2) Adicione o volume indicado de Tampão de Reconstituição e homogenize no vórtex, por 5 segundos, em velocidade máxima (não homogenize com a pipeta);	

- 3) Mantenha os tubos à temperatura ambiente, por 5 minutos, e homogenize no vórtex, por 5 segundos, em velocidade máxima;
- 4) Mantenha os tubos à temperatura ambiente por mais 2 minutos e homogenize-os no vórtex, por 5 segundos, em velocidade máxima;
- 5) Centrifugue os tubos por 5 segundos a 10.000 rpm para retirar a solução da tampa.

Atenção! Mantenha as soluções no gelo durante o uso e armazene à 20 °C após o uso.

11- Protocolo para extração de DNA/RNA de tecidos

Obs: Em caso de tecido fixado em etanol, submergir a amostra em 15 ml de água ultrapura e incubar por 5 minutos (repetir esse passo 2 vezes).

Para reconstituir a PK e o Carreador, veja o item 10: Preparo dos Reagentes (Reconstituição)

1- Colocar cerca de **5 a 30 mg** de tecido em um Tubo de Lise e identificar o tubo de lise.

Obs: A quantidade ideal pode variar de acordo com o tecido utilizado. Caso seja necessária a utilização de uma quantidade maior que a recomendada, divida a amostra duas ou mais vezes e utilize um tubo de lise para cada amostra. Prosiga com o protocolo abaixo. Atenção! O uso excessivo de amostras pode gerar um baixo rendimento de DNA/RNA purificado.

2- Após identificar os tubos de lise com amostras, adicionar **200 µl de Tampão ALR-PK** em cada Tubo de Lise.

3- Adicionar **4 µl de PK reconstituída** em cada Tubo de Lise com sua amostra. Homogeneizar no vórtex.

4- Incubar a **56 °C por 2 horas**. Esse tempo é suficiente para a lise da maioria dos tecidos, entretanto, não há problema em aumentar esse tempo, caso necessário (2 – 12 horas).

Obs: reduzir o tempo só é recomendado caso ocorra a dissolução completa da sua amostra.

5- Adicionar ao tubo de lise **400 µl de Solução de Lise**. Misturar no vórtex (velocidade máxima) por 5 segundos e centrifugar rapidamente (spin) para retirar o material da tampa do tubo.

6- Incubar a **56 °C por 5 a 15 minutos**.

Obs: em amostras com excesso de gordura e/ou quando ainda existirem fragmentos de tecido-alvo, é recomendado centrifugar por 5 minutos, em velocidade máxima, transferir a fase aquosa para um novo tubo (microtubo de 1,5 ml ou 2 mL, não incluso no kit) e então prosseguir com o protocolo.

7- Adicionar ao tubo de lise **2 µl de Carreador**.

Obs: A utilização do carreador é opcional; recomendamos apenas para amostras com baixa concentração de ácidos nucleicos (DNA/RNA) ou em quantidades/volumes inferiores ao recomendado.

8- Adicionar **100 µl de Etanol**. Homogeneizar com a pipeta.

9- Transferir o volume total da amostra (~750µl) para a **Coluna de Sílica com Tubo Coletor**, fechar a tampa da coluna e em seguida centrifugar por **3 minutos a 6.000 × g**.

10- Transferir a coluna para um novo Tubo Coletor e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado à coluna.

- 11- Com a coluna em um novo Tubo Coletor, adicionar **350 µl de Solução A**. Centrifugar por **30 segundos a 10.000 × g** com a tampa fechada. O DNA/RNA ficou ligado à coluna.
- 12- Adicionar **400 µl de Solução B**. Centrifugar por **30 segundos a 10.000 × g** com a tampa fechada. O DNA/RNA ficou ligado à coluna.
- 13- Transferir a Coluna para um novo Tubo Coletor e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado à coluna.
- 14- Centrifugar novamente por **3 minutos a 10.000 × g** com a tampa da coluna fechada, e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado na coluna. O objetivo é retirar toda a solução B da coluna.
- 15- Transferir a Coluna para um Tubo de Eluição (microtubo de 1,5 ml ou 2 mL, não incluso no kit).
- 16- Incubar a coluna à Temperatura Ambiente (T.A) por **5 a 10 minutos, com a tampa aberta**.
- 17- Adicionar, em cada coluna, de **25 a 50 µl de Tampão de Eluição** livre de RNase/DNase. Dispensar diretamente no centro da membrana.
- 18- Incubar à **T.A.** por **3 minutos** (tampa da coluna fechada).
- 19- Centrifugar por **3 minutos a 10.000 × g**, mantendo a tampa da coluna fechada. O DNA/RNA saiu da coluna.
Obs: Caso seja de interesse, realizar uma segunda eluição ou armazenar a coluna à -20°C para posterior nova eluição do material genético, repetindo o **passo 17 em diante**.
- 20- Usar ou armazenar o DNA/RNA purificado. Geladeira ou gelo para uso imediato; -20 °C ou temperatura inferior para uso posterior. A precipitação dos ácidos nucleicos é uma opção para conservar amostras por tempo prolongado. Use a solução de precipitação de ácidos nucleicos da PHT (não disponível neste Kit).

12- Preparo das amostras de sangue

Use, preferencialmente, sangue coletado em tubo contendo EDTA, para evitar coagulação.

Para amostras de sangue com eritrócitos nucleados (exemplo: aves) use entre 10 e 50 µl de sangue total. Use Solução Salina, PBS ou TE (não fornecidos neste Kit), complete o volume para 140 µl e siga para o passo 1 do protocolo abaixo.

Para capa leucocitária (concentrado de leucócitos) utilize entre 20 e 100 µl da amostra e complete o volume para 140 µl. Use Solução Salina, PBS ou TE (não fornecidos neste Kit). Siga para o passo 1 do protocolo abaixo.

Para amostras de sangue total (eritrócitos não nucleados) use de 20 a 140 µl e siga para o passo 1 do protocolo abaixo.

Para amostras de sangue total (eritrócitos não nucleados) com volume inferior a 140 µl, complete o volume para 140 µl com Solução Salina, PBS ou TE (não fornecidos neste Kit) e siga para o passo 1 do protocolo abaixo.

Para amostras de sangue em papel ou *swab*, hidrate a amostra com 140 µl de Solução Salina, PBS ou TE (não fornecidos neste Kit) por 10 minutos dentro do tubo de lise. Homogenize no vórtex por 5 segundos na velocidade máxima. Ao retirar o *swab*/papel, comprima-o contra a parede do tubo para recuperar toda a sua amostra. Pequenos fragmentos de papel ou algodão não irão interferir no resultado. Siga para o passo 1 do protocolo abaixo.

13- Protocolo para extração de DNA/RNA de sangue ou fluidos corporais ricos em matéria orgânica

Veja detalhes sobre o preparo das amostras acima (item 12).

Para reconstituir a PK e o Carreador, veja o item 10: Preparo dos Reagentes (Reconstituição)

1- Para sangue, adicionar **20-140µl** de amostra em um Tubo de Lise e identificar o tubo de lise. (Para volume inferior a 140 µl, complete o volume para 140 µl com salina, PBS ou TE).

1.1- Para fluidos corporais, adicionar **100 µl** de amostra em um Tubo de Lise e identificar o tubo de lise.

2- Adicionar **4 µl de PK reconstituída** em cada Tubo de Lise com sua amostra.

3- Adicionar **200 µl de Tampão ALR-PK** em cada Tubo de Lise. Homogenizar no vórtex.

4- Incubar a **56 °C** entre **30 minutos** a **2 horas**.

5- Adicionar ao tubo de lise **400 µl de Solução de Lise**. Misturar com o auxílio de pipeta até a solução ficar homogênea.

6- Incubar à temperatura ambiente por **5 a 10 minutos**.

7- Adicionar ao tubo de lise **2 µl de Carreador**.

8- Adicionar **100 µl de Etanol**. Homogenizar com a pipeta.

9- Transferir o volume total da amostra (~800µl) para a **Coluna de Sílica com Tubo Coletor**, fechar a tampa da coluna e em seguida centrifugar por **3 minutos a 6.000 × g**.

10- Transferir a coluna para um novo Tubo Coletor e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado à coluna.

11- Com a coluna em um novo Tubo Coletor, adicionar **350 µl de Solução A**. Centrifugar por **30 segundos a 10.000 × g** com a tampa fechada. O DNA/RNA ficou ligado à coluna.

12- Adicionar **400 µl de Solução B**. Centrifugar **por 30 segundos a 10.000 × g** com a tampa fechada. O DNA/RNA ficou ligado à coluna.

13- Transferir a Coluna para um novo Tubo Coletor e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado à coluna.

14- Centrifugar novamente por **3 minutos a 10.000 × g** com a tampa da coluna fechada, e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado à coluna. O objetivo é retirar toda solução B da coluna.

15- Transferir a Coluna para um Tubo de Eluição (microtubo de 1,5 ml ou 2 mL, não incluso no kit).

16- Incubar a coluna à Temperatura Ambiente (T.A) por **5 a 10 minutos, com a tampa aberta**.

17- Adicionar, em cada coluna, de **25 a 50 µl** de **Tampão de Eluição** livre de RNase/DNase. Dispensar diretamente no centro da membrana.

18- Incubar à **T.A.** por **3 minutos** (tampa da coluna fechada).

19- Centrifugar por **3 minutos a 10.000 × g**, mantendo a tampa da coluna fechada. O DNA/RNA saiu da coluna.

Obs: Caso seja de interesse, realizar uma segunda eluição ou armazenar a coluna à -20 °C para posterior nova eluição do material genético, repetindo o **passo 17 em diante**.

20- Usar ou armazenar o DNA/RNA purificado. Geladeira ou gelo para uso imediato; -20 °C ou temperatura inferior para uso posterior. A precipitação dos ácidos nucleicos é uma opção para conservar amostras por tempo prolongado. Use a solução de precipitação de ácidos nucleicos da PHT (não disponível neste Kit).

14- Protocolo para extração VIRAL e/ou fluidos corporais pobres em matéria orgânica

Atenção! Caso a amostra esteja congelada, descongele-a e a mantenha em gelo ou caixa térmica antes e durante o uso.

Para reconstituir a PK e o Carreador, veja o item 10: Preparo dos Reagentes (Reconstituição)

1- Identificar os tubos de lise. Adicionar **100 µl de amostra** em cada Tubo de Lise.

2- Adicionar **4 µl de PK reconstituída** em cada Tubo de Lise com sua amostra. Homogenizar no vórtex.

3- Incubar de **3 a 10 minutos** para ação efetiva da PK. Centrifugar rapidamente (spin) para retirar o material da tampa do tubo.

4- Adicionar ao tubo de lise **2 µl de Carreador**.

Obs: A utilização do carreador é opcional; recomendamos apenas para amostras com baixa concentração de ácidos nucleicos (DNA/RNA) ou em quantidade/volumes inferiores ao recomendado.

5- Adicionar ao tubo de lise **400 µl de Solução de Lise**. Misturar no vórtex (velocidade máxima) por 5 segundos e centrifugar rapidamente (spin) para retirar o material da tampa do tubo.

Obs: se houver macromoléculas visíveis a olho nu, centrifugar o tubo de lise por 1 minuto a 10.000 × g. Transferir o sobrenadante para um novo tubo (não fornecido no kit) e prosseguir para o passo 6. Macromoléculas podem prejudicar o processo por entupimento parcial ou total da coluna de sílica.

6- Adicionar **250 µl de Etanol**. Homogenizar com a pipeta.

7- Transferir o volume total da amostra (~750µl) para a **Coluna de Sílica com Tubo Coletor**, fechar a tampa da coluna e em seguida centrifugar por **2 minutos a 6.000 × g**.

8- Transferir a coluna para um novo Tubo Coletor e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado à coluna.

9- Com a coluna em um novo Tubo Coletor, adicionar **350 µl de Solução A**. Centrifugar por **30 segundos a 10.000 × g** com a tampa fechada. O DNA/RNA ficou ligado à coluna.

10- Adicionar **400 µl de Solução B**. Centrifugar **por 30 segundos a 10.000 × g** com a tampa fechada. O DNA/RNA ficou ligado à coluna.

11- Transferir a Coluna para um novo Tubo Coletor e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. DNA/RNA está ligado à coluna.

12- Centrifugar novamente por **3 minutos a 10.000 × g**, com a tampa da coluna fechada, e descartar o Tubo Coletor com o filtrado. O DNA/RNA está ligado à coluna. O objetivo é retirar toda Solução B da coluna.

13- Transferir a Coluna para um Tubo de Eluição (microtubo de 1,5 ml ou 2 mL, não incluso no kit).

14- Incubar a coluna à Temperatura Ambiente (T.A) por **5 a 10 minutos, com a tampa aberta**.

15- Adicionar, em cada coluna, de **25 a 50 µl de Tampão de Eluição** livre de RNase/DNase. Dispensar diretamente no centro da membrana.

16- Incubar à T.A. por 3 minutos (tampa da coluna fechada).

17- Centrifugar por **3 minutos a 10.000 × g**, mantendo a tampa da coluna fechada. O DNA/RNA saiu da coluna.

Obs: Caso seja de interesse, realizar uma segunda eluição ou armazenar a coluna à -20 °C para posterior nova eluição do material genético, repetindo o **passo 15 em diante**.

18- Usar ou armazenar o DNA/RNA purificado. Geladeira ou gelo para uso imediato; -20 °C ou temperatura inferior para uso posterior. A precipitação dos ácidos nucleicos é uma opção para conservar amostras por tempo prolongado. Use a solução de precipitação de ácidos nucleicos da PHT (não disponível neste Kit).

15- Limitações

O armazenamento do Kit em temperaturas abaixo da recomendada pode contribuir para a precipitação da Solução de Lise. No caso de formação de precipitado, deve-se incubar a solução em banho-maria (40 °C a 50 °C) até a completa solubilização do precipitado. O não cumprimento dos cuidados especiais para a correta manipulação das amostras pode invalidar os resultados. Uso exclusivo para pesquisa.

16- Referência bibliográfica

Sambrook, Joseph. Russell, David William. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

17- Atendimento ao consumidor

Serviço de Atendimento ao Consumidor (SAC): o contato pode ser feito pelo e-mail **pht@phoneutria.com.br** ou pelos telefones **(31) 99585-3050** e **(31) 3427-6413**. Horário de atendimento: Segunda-feira à sexta-feira, de 08h às 17h.

18- Simbologia utilizada nos rótulos

Símbolo	Título/Palavra de Advertência	Símbolo	Título/Palavra de Advertência
	Consultar as instruções de utilização		Fabricante
	Data de Fabricação		Data de Validade
	Nº de lote		Limites de temperatura para transporte e armazenamento
	Conservar em local seco		Manter afastado da luz solar
	Atenção! H319 P264, P280		Atenção! H226 P210, P233, P240, P241, P242, P243, P280
	Perigo! 1, 1A, 1B, 1C H318/H314 P280, P260, P264, P280		Perigo! 1 H334 P261, P284

Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA

CNPJ: 00.353.885/0001-02

Endereço: Rua Teles de Menezes, 148 - Santa Branca

Belo Horizonte – Minas Gerais – CEP: 31565-130

.1 de 11