



# PCRun® Kit de Extração de DNA para 8 tubos LEISHMANIA - Cat. Nº 30PRE208

## Manual do usuário – Para extração de DNA para uso posterior com o kit de detecção molecular PCRun (SKU 30CLI108)

### USO PRETENDIDO

O PCRun Sample Prep destina-se à extração de **DNA de sangue total, medula óssea, fluidos corporais, urina concentrada, swabs e aspirações por agulha fina (PAAF)**, em aproximadamente 15 minutos. Amostras de sangue coletadas com EDTA de preferência.

### PRINCÍPIO

O PCRun Sample Prep é baseado na tecnologia Zymo, que envolve lise de células, adesão a uma membrana seletiva, remoção de inibidores por 2 lavagens rápidas e eluição de DNA.

### ARMAZENAMENTO E MANUSEIO

Temperatura ambiente (21-25 °C)

Evite a exposição direta à luz solar

Não utilize após a data de validade impressa no rótulo da embalagem

Não congele nem exponha a temperaturas extrema

### RECOMENDAÇÕES

Se o tampão de pré-lavagem de DNA **(B)** não estiver transparente, aqueça-o a 30-37 °C por 30 minutos e misture invertendo. **Não leve ao micro-ondas!**

### PRECAUÇÕES

Luvas de laboratório limpas devem ser usadas durante o procedimento de extração.

Não utilize o kit se algum dos componentes estiver danificado.

Cada componente deste kit é adequado para uso somente com um número de lote específico.

Não misture componentes de números de lote diferentes.

Use procedimentos sanitários aceitos designados para resíduos biológicos e moleculares ao manusear e descartar componentes do kit.

Realize a extração de DNA em uma área separada da área usada para detecção da reação.

### EQUIPAMENTO A SER FORNECIDO PELO USUÁRIO

Microcentrífuga para tubos eppendorf, que atinja uma velocidade de 10.000 x g. Anexada tabela de conversão x g (RCF) para RPM.

Luvas de proteção de laboratório

Marcador indelével de ponta fina

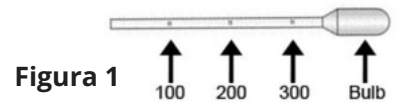
Temporizador

### COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

Para obter resultados ideais, recomenda-se o uso de amostras recém-coletadas. As amostras podem ser mantidas a 4 °C por até 24 horas ou a -20 °C por um período prolongado. O modo de processamento dos diferentes tipos de amostras pode ser encontrado nos protocolos específicos na próxima página.

### CONTEÚDO DO KIT

| Componentes                                                          | Quantia            |
|----------------------------------------------------------------------|--------------------|
| Pastilhas descartáveis para transferência de líquidos                | 35                 |
| Frascos contendo tampão de lise genômica (A) (contém mercaptoetanol) | 8 frascos / 400 µl |
| Frasco contendo tampão de pré-lavagem de DNA (B)                     | 1 frasco / 2ml     |
| Frasco contendo tampão de lavagem de gDNA (C)                        | 1 frasco / 4,5 ml  |
| Frasco contendo tampão de eluição de DNA (D)                         | 1 frasco / 1ml     |
| Colunas Zymo Spin                                                    | 8                  |
| Tubos de coleta para coleta de resíduos                              | 16                 |
| Pipetas capilares de plástico 50 µl                                  | 10                 |
| Pipetas de 1,5 ml para coleta de DNA extraído                        | 8                  |
| Manual de instruções                                                 | 1                  |
| Cartão de Protocolo de Referência Rápida                             | 1                  |

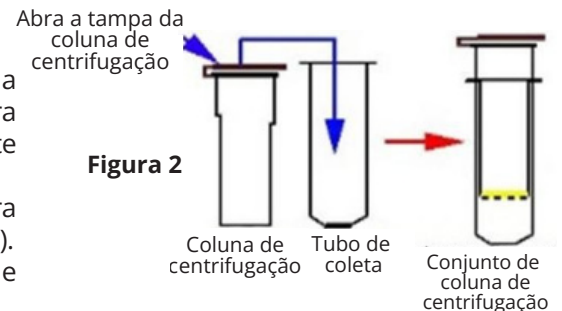


## Protocolos de Extração de DNA

Pipetas plásticas graduadas descartáveis são fornecidas com o kit para transferência dos diversos componentes líquidos, exceto o Tampão D. A ponta é marcada com três linhas representando volumes de 100 µl (Fig. 1). Para transferir um volume de amostra ou tampão, o bulbo deve ser pressionado para expelir o ar, a ponta da pipeta deve ser mergulhada no líquido e a pressão exercida sobre o bulbo deve ser liberada até que o fluido atinja a linha desejada. O líquido é liberado no recipiente alvo aplicando-se pressão no bulbo. As pipetas são descartáveis e devem ser usadas somente conforme indicado nas instruções. Pipetas capilares de plásticos de 50 µl, são fornecidas para uso com o Tampão D.

### A. Extração de DNA de sangue total e medula óssea

1. Usando uma pipeta limpa, pipete 100 µl da amostra (Fig. 1) e adicione a um frasco contendo Tampão A. Misture bem. Deixe em temperatura ambiente por 5 minutos. Descarte a pipeta usada em um recipiente adequado para resíduos de risco biológico.
2. Usando uma pipeta limpa, transfira a mistura de amostra/tampão A para uma coluna de centrifugação que foi colocada em um tubo de coleta (Fig. 2).
3. Centrifugue a 10.000 x g por 1 minuto. Descarte o tubo de coleta e coloque a coluna de centrifugação em um tubo de coleta limpo.
4. Usando uma pipeta limpa, adicione 200 µl (Fig. 1) de Tampão B à Coluna de Centrifugação. Centrifugue a 10.000 x g por 1 minuto. Não há necessidade de esvaziar o Tubo de Coleta.
5. Usando uma pipeta limpa, adicione 500 µl de Tampão C à Coluna de Centrifugação (preencha a pipeta com 300 µl, adicione o tampão na Coluna de Centrifugação e repita a ação preenchendo a pipeta com 200 µl, totalizando 500 µl). Centrifugue a 10.000 x g por 3 minutos.
6. Transfira a coluna de centrifugação para um tubo limpo de 1,5 ml. Usando o tubo capilar de 50 µl, adicione 50 µl de tampão D à coluna de centrifugação. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar a 10.000 x g por 30 segundos. O DNA será liberado no tubo de 1,5 ml. Descartar a coluna de centrifugação e fechar a tampa do tubo de 1,5 ml. Identifique o tubo com um código de amostra.
7. O DNA extraído deve ser utilizado o mais breve possível, mas pode ser conservado por 24 horas a 4°C, por duas semanas a -20°C ou por um período mais prolongado a -70°C. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.



### B. Extração de DNA de amostras de urina

O DNA pode ser extraído de células e patógenos presentes em amostras de urina. Colete aproximadamente 2 ml de urina. A amostra de urina deve ser processada imediatamente após a coleta, seguindo as instruções a seguir.

1. Adicione 100 µl de PBS 10X (não fornecido) a cada 1 ml de urina fresca e misture bem.
2. Centrifugue a 10.000 x g por 10 minutos.
3. Descarte o sobrenadante deixando o pellet no fundo do tubo.
4. Ressuspensão do pellet em 100 µl de PBS 1X (não fornecido).
5. Extraia o DNA de acordo com o protocolo A (veja acima).

### C. Extração de DNA de amostras de swabs

O DNA pode ser extraído de amostras clínicas coletadas em swabs. É importante esfregar bem a área infectada para coletar tecido suficiente no swab. Swabs que não contêm material biológico suficiente não são uma boa fonte para purificação de DNA.

1. Corte a área do swab contendo o material biológico e transfira para um frasco com 500 µl de Tampão A.
2. Deixe descansar em temperatura ambiente por 10 minutos, misturando bem várias vezes durante esse período.
3. Remova o swab pressionando-o firmemente contra a lateral do tubo para remover todo o líquido.
4. Transfira a mistura para uma coluna de centrifugação e continue como no protocolo A3 (acima).

### D. Extração de DNA de aspirações por agulha fina

Este protocolo pode ser usado para aspirações por agulha fina (PAAF) de tecidos moles frescos ou congelados, como linfonodos e baço. O tecido deve ser homogeneizado antes da extração.

1. A homogeneização da PAAF é realizada em 400 µl de Tampão A. Adicione o tecido a um frasco de Tampão A. Incube em temperatura ambiente por 5 minutos, agitando bem o frasco a cada minuto para dispersar o tecido.
2. Centrifugue o tecido/solução tampão A a 10.000 x g por 5 minutos.
3. Remova o sobrenadante sem desfazer o sedimento e transfira o sobrenadante para a coluna de centrifugação, que foi colocada em um tubo de coleta. Continue a partir da etapa 3 do protocolo A (acima).