



PCRRun® Kit de Extração de DNA 4 amostras

Cat. No.30PRE104

Para Kits PCRRun *Canine Anaplasma*, *Babesia Gibsoni*, *Babesia species*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Leptospiracanis*, *Canine/Feline hepatozoon*, *Canine/Feline parvovirus*, *Feline leukemia*, *Feline mycoplasma*

Manual do Usuário

Para extração in vitro de DNA para uso subsequente com o Kit de Detecção Molecular PCRRun®

FINALIDADE

O PCRRun® Sample Prep Rapid DNA Extraction Kit destina-se à extração de DNA de sangue, medula óssea e swab. Consulte o manual de instruções do PCRRun® para determinar qual tipo de amostra é indicado para o kit de diagnóstico escolhido. O kit contém todos os componentes descartáveis necessários para realizar a extração de DNA, compatível com os kits moleculares PCRRun®. A extração de DNA pode ser realizada com o uso de uma microcentrífuga ou por deslocamento manual com uma seringa de 10 mL fornecida. Ambos os métodos são descritos neste manual.

- **Armazenamento:** 2-25°C (temperatura ambiente ou refrigerado).
- Evite exposição à luz solar direta.
- Não utilize após a data de validade indicada na embalagem.
- Não congele ou exponha a temperaturas extremas.

PRECAUÇÕES

- Utilize luvas de laboratório limpas durante o teste.
- Abra o recipiente de reação apenas antes do uso.
- Não utilize o kit se algum de seus componentes estiver danificado.
- Cada componente deste kit é adequado apenas para uso com um número de lote específico. Os componentes foram aprovados no controle de qualidade como um lote padrão. Não misture componentes de lotes diferentes.
- Utilize procedimentos sanitários adequados para resíduos biológicos e moleculares durante o manuseio e descarte dos componentes do kit.
- Realize a extração de DNA em uma área separada da utilizada para o preparo da reação PCRRun®.

PRINCÍPIO

O PCRRun® Sample Prep Rapid DNA Extraction Kit baseia-se na desnaturação térmica de proteínas e separação do DNA em coluna. Os inibidores da amplificação isotérmica são removidos durante o processo, e o extrato de DNA é liberado em um tampão compatível para reações subsequentes.

LIMITAÇÕES

O PCRrun® Sample Prep é projetado para uso com os kits de detecção molecular PCRrun® da Biogal.

COMPONENTES DO KIT

Componentes	Quantidade
Colunas PCRrun® contendo Tampão de Extração PCRrun® - Tampa Vermelha	4 colunas/ 50 µL
Frascos de coleta contendo Tampão de Diluição PCRrun® - Tampa Verde	4 frascos/380 µL
Tubos capilares de plástico descartáveis - 50 µL	1 pacote - 5 tubos
Tampa com Luer Lock para acoplamento de seringa	4
Seringa de 10 mL	1
Manual de Instruções	1

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS DO USUÁRIO (NÃO FORNECIDOS)

- Microcentrífuga, adequada para tubos eppendorf, que alcance uma velocidade de (10.000 X g) e (1.500X g). Veja Tabelas de conversão **xg** para **RPM** anexadas.
- Cronômetro.
- Bloco de aquecimento que mantém 95 °C: compatível com tubos Eppendorf de 1,5 mL (pode ser adquirido da Biogal).
- Luvas de proteção para laboratório.
- Marcador permanente de ponta fina.

COLETA, ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

O kit é adequado para a extração de ácido nucleico de 50 µL de sangue total, medula óssea, 1 mL de urina e de swab. Consulte o manual de instruções do PCRrun® para determinar o tipo de amostra adequado para fins diagnósticos. ****Observação:**** PBS 10X e PBS 1X são fornecidos com os kits PCRrun® que recomendam a análise de amostras de urina.

❖ Sangue e medula óssea:

O sangue total pode ser coletado de preferência com EDTA.

❖ Sedimento de Urina: kits diagnóstico para leptospira, leishmania e cinomose

Adicione 100 µL de PBS 10X a 1 mL de urina fresca. Centrifugue a amostra em alta velocidade (10.000 x g) por dez minutos. Descarte o sobrenadante e ressuspensa o material sólido (pellet) do fundo do tubo com 50 µL de PBS 1X antes da extração de DNA. As amostras de urina concentrada podem ser armazenadas congeladas.

> Extração de DNA de amostras de swabs.

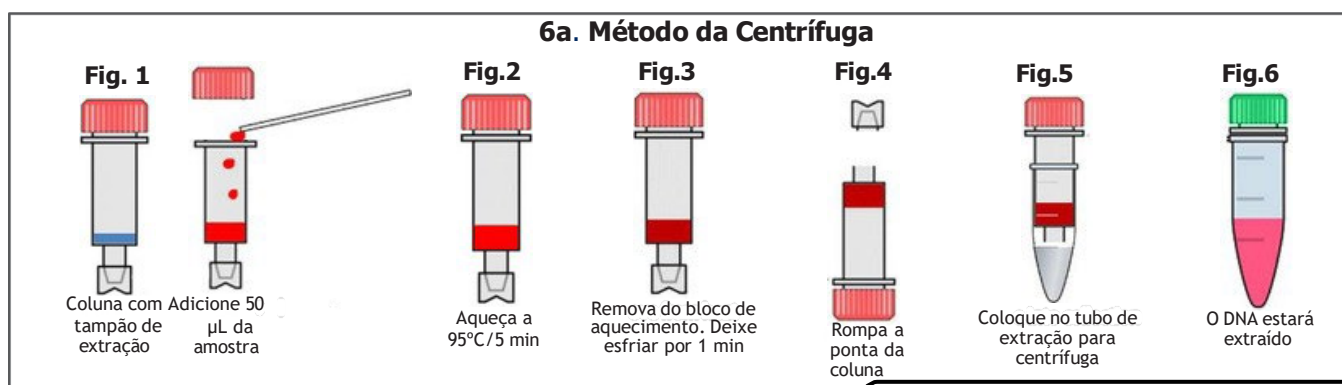
O DNA pode ser extraído de amostras clínicas coletadas em swabs. É importante esfregar bem a área infectada para coletar tecido suficiente no swab. Swabs que não contêm material biológico suficiente não são uma boa fonte para purificação de DNA.

1. Corte a área do swab contendo o material biológico e transfira para um frasco com 500 µL de Tampão
2. Deixe 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. Utilize 50 µL da amostra para a Extração do DNA. Siga o Protocolo de Extração na próxima página. (3)

- Ligue o bloco de aquecimento e ajuste a temperatura para 95°C. Quando a temperatura-alvo for atingida, inicie a extração de DNA. Antes de começar a extração de DNA, bata levemente a coluna na bancada para garantir que todo o tampão de extração esteja acima do filtro da coluna.
 - Repita o mesmo com os frascos de coleta contendo o tampão de diluição.
1. Utilize o tubo capilar de 50 µL para adicionar 50 µL da amostra homogeneizada ao tampão de extração PCRun® na coluna (tampa vermelha). (Fig 1)
 2. Feche a coluna e misture batendo levemente na lateral da coluna.
 3. Coloque a coluna no orifício adequado do bloco pré-aquecido (Fig 2).
 4. Incube no bloco de aquecimento (95°C) por 5 min.
 5. Remova a coluna do bloco de aquecimento. Afrouxe apenas a tampa vermelha. Resfrie a coluna com a amostra por 1 min em temperatura ambiente (Fig 3).
 6. Ao utilizar o bloco de aquecimento para uma reação PCRun®, resfrie o instrumento para 60°C reduzindo a temperatura-alvo na tela de controle do bloco. O processo de resfriamento pode levar até 15 minutos. Para acelerar o processo, o bloco pode ser removido com o auxílio do Elevador de Bloco fornecido com o instrumento e colocado em um ambiente frio por alguns minutos. Evite contato com a pele ou roupas ao remover o bloco quente. Prossiga com o método de centrifuga (6a) ou seringa (6b).

6a. Método da Centrifuga

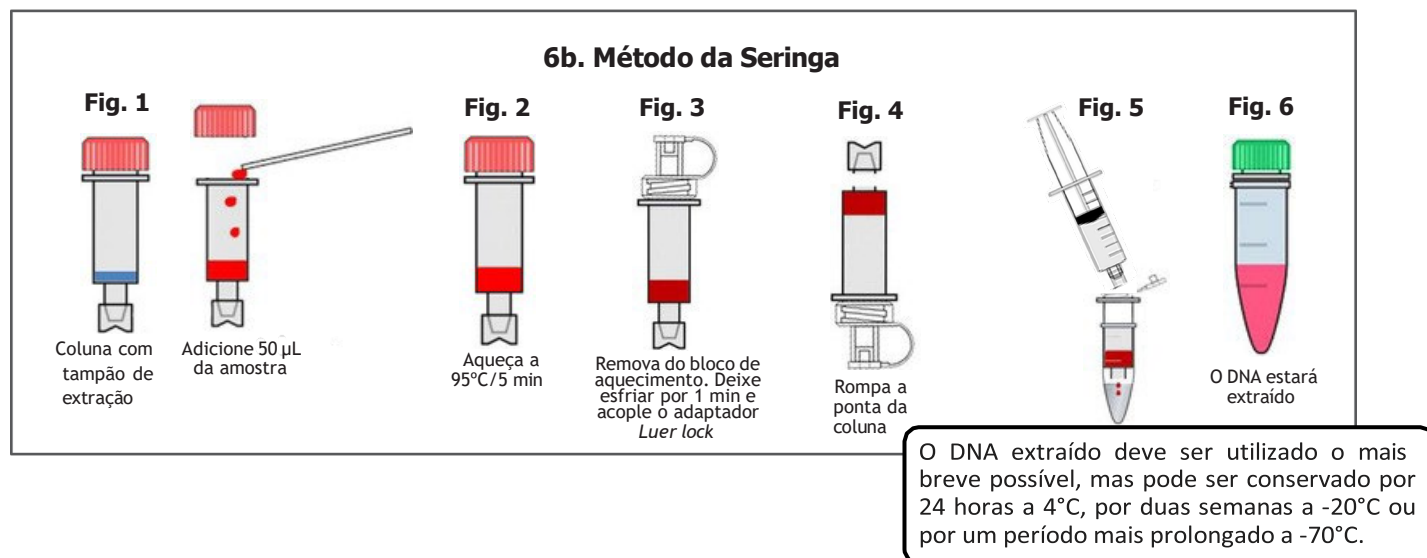
- Aperte a tampa vermelha. Inverta a coluna e rompa a base da coluna (Fig 4). Evite contaminação cruzada entre colunas ao analisar mais de uma amostra!
- Coloque a coluna em um frasco de coleta de 1,5 mL contendo o Tampão de Diluição PCRun® (tampa verde) (Fig 5). Guarde a tampa verde para uso posterior.
- Centrifugue a coluna/frasco de coleta a 1.500 x g por 1 min. Prossiga com o passo 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.

6b. Método da Seringa

- Remova a tampa vermelha e substituí-la pela tampa de *Luer Lock* (Fig 3). Rosqueie firmemente a tampa de Luer Lock na coluna e feche a abertura da tampa com o plugue anexado.
 - Inverta a coluna e rompa a base da coluna (Fig 4). Evite contaminação cruzada entre colunas ao analisar mais de uma amostra!
 - Coloque a coluna em um frasco de coleta de 1,5 mL contendo Tampão de Diluição PCRun®. Guarde a tampa para uso posterior.
 - Remova o plugue da tampa de Luer Lock.
 - Segure a seringa firmemente e deslocar 10 mL de ar puxando o êmbolo até a linha de 10 mL (posição aberta).
 - Com o êmbolo na posição aberta, acople firmemente a seringa de 10 mL ao bico. Certificar-se de que todas as conexões estejam herméticas (Fig 5).
 - Aplique pressão suave no êmbolo da seringa. Continue a aplicar pressão até sentir resistência. Observar a área entre a ponta da coluna e o tampão de diluição. Nesta etapa, um pequeno volume de líquido, na forma de gotas ou bolhas, cairá no Tampão de Diluição. Se o líquido não for liberado da coluna, desacople a seringa e repita os dois últimos passos (Fig 5).
7. Desacople o frasco de coleta da coluna e descarte a coluna em um recipiente para resíduos biológicos.
8. Tampar o tubo com a tampa verde e misturar bem o conteúdo do frasco de coleta, que agora contém o DNA extraído (Fig 6).
9. O DNA extraído está pronto para uso na maioria das reações PCRun®. Recomenda-se utilizar o DNA recém-extraído para as reações PCRun®. Os extratos de DNA podem ser mantidos a -20°C por períodos prolongados. Evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento.



Fabricante: Biogal Galed Labs. Acs. Ltd.
FAX: +972 (0)4 9898690 E-mail: info@biogal.com
www.biogal.com Kibbutz Galed, 1924000 - Israel



Representante Exclusivo no Brasil, Importador e Distribuidor:
JMR TRADING LTDA / VPDIAGNÓSTICO: CNPJ: 11.857.347/0001-71
Rua Mandaguari, 1752 - Pinhais - Paraná-Brasil
Fone (41) 3434-2721 e-mail: info@vpdiagnostico.com.br
Resp. Tec.: Dra. Margareth Carvalho S. Agottani CRMV-PR nº 3288
PRODUTO PARA USO VETERINÁRIO – NÃO NECESSITA DE REGISTRO