

Extracta Kit

DNA TOTAL DE TECIDO ANIMAL

Kit de extração de ácidos nucleicos por beads magnéticas - para utilização nos sistemas automatizados de extração

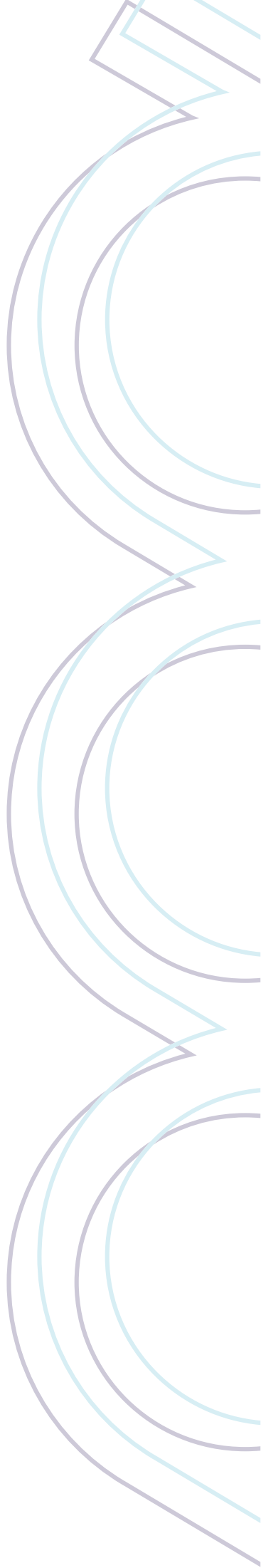
EXTRACTA 16 e EXTRACTA 32

Código do produto: MTTD-P016

Protocolo

INDICE

1	INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA	5
2	INTRODUÇÃO	6
2.1	Utilização do kit	6
2.2	Propósito	6
2.3	Princípio	6
3	APRESENTAÇÃO	7
3.1	Componentes/materiais inclusos	7
3.2	Materiais requeridos e não inclusos	8
3.3	Condições de armazenamento	8
3.4	Coleta, transporte, armazenamento e pré-tratamento da amostra	8
3.5	Precauções	8
4	UTILIZAÇÃO	10
5	RESULTADOS	12
5.1	Resultados esperados dos produtos da extração/purificação	12
5.2	Performance dos reagentes	12



1 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA

Para uso seguro e proveitoso desse kit, leia atentamente este manual de instruções antes da utilização.

- O kit de extração e purificação **EXTRACTA Kit - DNA total de tecido animal (MTTD-P016)** é destinado exclusivamente às práticas de laboratório, com a finalidade de extração e purificação de **DNA total** de tecido animal em equipamentos de extração automatizada para utilização em pesquisa científica (RUO). Seu uso indevido ou estranho à finalidade é de total responsabilidade do usuário.
- Evite o contato dos reagentes com os olhos, pele e roupa. Em caso de contato, lave abundantemente a região de contato com água corrente. Se o contato causar alguma reação alérgica ou efeito adverso, procure um médico.
- Em qualquer caso de incidente envolvendo o kit ou reagentes, entre em contato com o fabricante e autoridades competentes.
- Siga atentamente as instruções do manual do equipamento de automação **EXTRACTA 32** ou **EXTRACTA 16** para orientações sobre a utilização das placas e kits no equipamento.
- Evite utilizar reagentes fora do prazo de validade, informado na embalagem do produto.
- Não mantenha os reagentes e placas abertas expostos ao ar. A evaporação pode acarretar em mudança de pH e influenciar a eficiência da extração.
- Todos os reagentes são incolores e transparentes, exceto a solução contendo beads magnéticas. Reagentes apresentando alguma coloração estranha indicam contaminação e não devem ser utilizados.
- As práticas de coleta de amostra de tecido animal devem seguir as normas estabelecidas pelo comitê de ética. Segundo a Lei Arouca (11.794/2008), todo experimento que puder causar dor ou angústia ao animal deve ser desenvolvido sob sedação, analgesia ou anestesia adequadas.
- No Brasil, há três legislações que tratam diretamente sobre o uso de animais em pesquisas: a Lei Arouca (11.794/2008), o Decreto nº 6899/2009 e a Resolução Concea nº12/2013, sobre a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos. É importante que a prática de utilização de animais na pesquisa ou no provimento de amostras esteja em consonância com a legislação nacional.
- Após a utilização, os plásticos e reagentes devem ser descartados em local apropriado para descarte de material contaminado com amostras biológicas.

2 INTRODUÇÃO

2.1 Utilização do kit

O kit de extração **EXTRACTA Kit - DNA total de tecido animal (MTTD-P016)** deve ser utilizado para o isolamento de **DNA total (maiores que 0,5 kb)** de tecido animal. A extração automatizada de ácidos nucleicos deve ser feita utilizando o kit de extração no extrator automático **EXTRACTA 16** ou **EXTRACTA 32**, marca Loccus. Os ácidos nucleicos extraídos/purificados podem ser analisados por aplicações posteriores, como PCR, PCR em tempo real, sequenciamento de nova geração, entre outras técnicas.

2.2 Propósito

O kit de extração de ácidos nucleicos **EXTRACTA Kit - DNA total de tecido animal (MTTD-P016)** provê um método simples para extrair e isolar **DNA total (maiores que 0,5 kb)** de tecidos de difícil lise. A amostra primeiramente precisa ser tratada com Proteinase K antes de ser submetida ao processo de extração automatizada pelo equipamento **EXTRACTA 16** ou **EXTRACTA 32**. O protocolo em questão reduz o tempo experimental e aumenta a consistência e reprodutibilidade do isolamento do DNA, sendo compatível com laboratórios de alto volume de extrações. Com alta sensibilidade, os reagentes deste kit podem ser aplicados para diagnósticos clínicos e pesquisas.

2.3 Princípio

A camada de Dióxido de Silício, que reveste as beads magnéticas, adsorve moléculas negativamente carregadas, promovendo a sua ligação com as moléculas de ácidos nucleicos presentes na amostra. A separação ocorre por meio de hastes magnetizadas com alto poder de atração e decorrentes etapas de lavagem e eluição, como mostra a figura.

Tipos de amostras: 50-100mg de tecido animal

Equipamento recomendado: **EXTRACTA 16** ou **EXTRACTA 32** - São os modelos compatíveis com as placas deepwell de 96 poços

Para maiores informações sobre o extrator automatizado de ácidos nucleicos **EXTRACTA**, consulte o manual de instruções do equipamento.

Extração/purificação por beads magnéticas

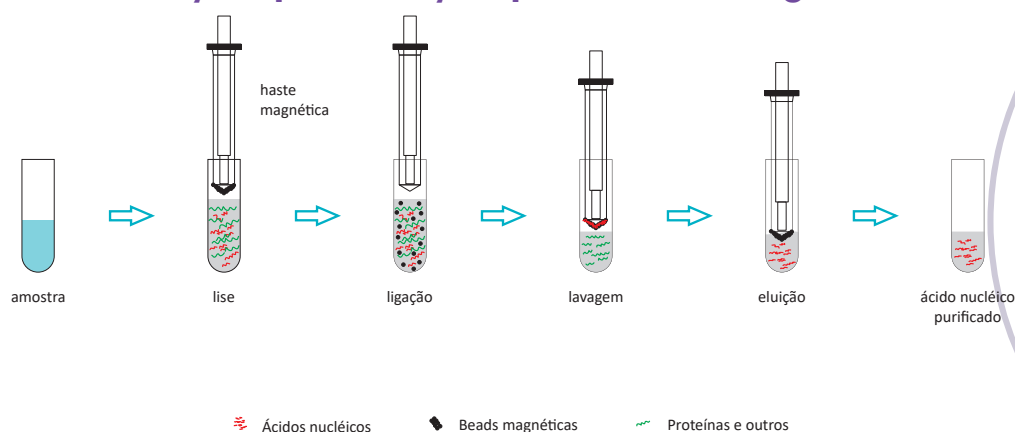


Figura 1: Modelo esquemático da extração/purificação por beads magnéticas

3 APRESENTAÇÃO

3.1 Componentes/materiais inclusos

Conteúdo do kit:

Item	Quantidade	Descrição
Placas com reagentes	6 unidades	Placa deepwell de 96 poços com reagentes, para o processamento de 16 amostras cada
Tampão PK	25mL	Tampão Tris, Surfactantes, pH 8.0
Tampão de eluição	15mL (10 tubos de 1,5mL)	Tampão Tris
Proteinase K	20mg	Enzima Proteinase K
Tiras plásticas (8 canais)	12 unidades	Tiras plástica descartável para haste magnética do EXTRACTA 16 e EXTRACTA 32
Protocolo	1 unidade	Manual de instruções para o usuário

ATENÇÃO: Existem 2 formas de apresentação da Proteinase K. Caso ela esteja eluída (em solução), armazenar à temperatura de 4°C. Se ela estiver liofilizada (em pó), ela deve ser armazenada à temperatura de -20°C. Para utilizá-la, adicionar 1mL de Tampão de Eluição ao tubo, homogeneizar e armazenar à 4°C.

Conteúdo das placas:

Colunas	Conteúdo	Volume
1 e 7	Tampão de lise, onde deverão ser aplicadas as amostras	700µL
2 e 8	Tampão de lavagem 1	800µL
3 e 9	Beads magnéticas	800µL
4 e 10	Tampão de lavagem 2	800µL
5 e 11	Tampão de lavagem 2	800µL
6 e 12	Tampão de eluição, onde estará o DNA purificado ao final do processo	130µL

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1						9					
B	2						10					
C	3						11					
D	4						12					
E	5						13					
F	6						14					
G	7						15					
H	8						16					

Poços coloridos, numerados de 1 a 16: onde deverão ser aplicadas as amostras

Figura 2: Ilustração de uma placa com reagentes.

3.2 Materiais requeridos e não inclusos

- Sistema automatizado de extração de ácidos nucleicos **EXTRACTA 16** ou **EXTRACTA 32**;
- Luvas descartáveis;
- Micropipetas e ponteiras descartáveis (10µL / 200µL / 1000µL) - DNase/RNase free;
- Tubos de micro centrífuga de 1,5mL estéreis ou placas para armazenamento do RNA eluído;
- Centrífuga para placas deepwell (opcional: modelo PlateSpin 3, marca Kubota);
- Centrífuga para microtubos;
- Seladora de microplacas (opcional: modelo L-Plate Sealer, marca Loccus);
- RNase A (opcional).

OBS: Todos os materiais e instrumentos que forem entrar em contato com as mostras ou reagentes devem ser estéreis e livres de nucleases para garantir a qualidade do resultado.

3.3 Condições de armazenamento

- Reagentes podem ser mantidos em temperatura ambiente (15-35°C) e podem ser utilizados até a data de expiração contida nas suas respectivas embalagens.
- A **Proteinase K** liofilizada deve ser armazenada à -20°C. O congelamento e descongelamento da **Proteinase K** pode prejudicar sua atividade enzimática.


3.4 Coleta, transporte, armazenamento e pré-tratamento da amostra

Em geral, o tecido animal pode ser mantido à temperatura ambiente por 24 horas, 2-8°C por até 7 dias, -20°C para preservação a longo prazo.

O transporte dos tecidos animais deve ocorrer de acordo com a regulamentação específica relacionada a tecidos. Amostras animais devem ser mantidas à temperatura de 2 a 25°C durante o transporte.

3.5 Precauções

- Evite utilizar reagentes fora do prazo de validade;
- Quando a temperatura ambiente for menor que 20°C, aqueça os reagentes em banho maria pré-aquecido à 42°C por 5 a 10 minutos;
- Evite agitar os frascos e placas vigorosamente para impedir a formação excessiva de espuma;
- Não mantenha os reagentes e placas abertas expostos ao ar. A evaporação pode acarretar em mudança de pH e influenciar a eficiência da extração;
- Todos os reagentes são incolores e transparentes, exceto a solução contendo beads magnéticas. Reagentes apresentando alguma coloração estranha indicam contaminação e não devem ser utilizados;
- Antes da utilização, verifique a integridade da placa com reagentes e lembre-se de posicionar as hastes plásticas nas hastes magnéticas do equipamento **EXTRACTA 16** ou **EXTRACTA 32**;
- É recomendada uma rápida centrifugação das placas antes da utilização para concentrar todo o volume de reagentes no fundo dos poços;
- Utilize máscara e luvas descartáveis ao utilizar o kit de extração;

- 
- Remova a película de alumínio das placas com cuidado para evitar respingos;
 - Use consumíveis estéreis e livre de nucleases para evitar contaminação das amostras;
 - As soluções de reagentes contêm Guanidina. Evite a limpeza dos materiais que entrarão em contato com os reagentes com soluções contendo detergente
 - Evite contato dos reagentes com os olhos, pele e roupa. Em caso de contato utilize água corrente;
 - Em qualquer caso de incidente, por gentileza contate o fabricante e as autoridades competentes.

4 UTILIZAÇÃO

Protocolo de extração de ácidos nucléicos

- Para cada amostra a ser processada, separe um microtubo. Adicione a cada microtubo 200µL de Tampão PK e 10µL de Proteinase K;
- Acrescente 50-100mg de tecido da amostra no microtubo correspondente. Homogenize a mistura e incube a 56°C por 30-60min;
- Centrifugue os tubos a 8000rpm por 1min;
- Com a placa ainda selada, faça uma rápida centrifugação para que todo o volume de reagentes seja concentrado no fundo dos poços. Feito isso, remova cuidadosamente a película de alumínio que veda a placa;
- Transfira 200µL do sobrenadante do tubo de amostra para o poço nº1, localizado na localização A1 da placa. Faça isso para o restante das amostras sucessivamente, aplicando cada amostra em um dos poços seguintes (de número 2 a 16), demarcados em azul na Figura 3, abaixo:

poços nos quais deverão ser aplicadas as amostras

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1						9					
B	2						10					
C	3						11					
D	4						12					
E	5						13					
F	6						14					
G	7						15					
H	8						16					

Poços coloridos, numerados de 1 a 16: onde deverão ser aplicadas as amostras.

Figura 3: Ilustração da placa com reagentes. Poços coloridos representam onde deverão ser aplicadas as amostras. São 16 amostras por placa.

NOTA: A proporção de volume de amostra e tampão de lise é de aproximadamente 200µL:600µL. Caso esta proporção seja alterada, a performance da extração pode ser afetada.

- Instale as tiras plásticas na parte superior extrator automatizado de ácidos nucléicos **EXTRACTA 16** ou **32**, para a proteção das hastes magnéticas. Para cada placa utilize 2 hastes plásticas;
- Posicione a placa no extrator automatizado **EXTRACTA 16** ou **EXTRACTA 32** de forma com que a extremidade recortada da placa (próxima ao poço H1) se encontre na posição inferior esquerda. A linha "A" da placa deverá ficar voltada para a parte interior do equipamento e a linha "H" voltada para a parte de fora (frente) do sistema;
- Selecione e execute o protocolo de extração 'MTTDP016' no equipamento **EXTRACTA 16** ou **EXTRACTA 32**;
- Após a finalização do programa, retire a placa cuidadosamente do extrator automático;

5 RESULTADOS

5.1 Resultados esperados dos produtos da extração/purificação

- Rendimento médio de DNA: 2-5µg;
- Razão 260/280: 1.7-1.9.

5.2 Performance dos reagentes

- Repetibilidade:

Em condições de repetibilidade nas quais os ácidos nucleicos são extraídos e purificados seguindo o mesmo protocolo e com o mesmo kit de reagentes, com o mesmo lote, utilizando a mesma amostra e manipulado pelo mesmo operador, o coeficiente de variação da concentração de ácidos nucleicos extraídos é inferior a 5%.

- Reprodutibilidade:

Um teste de reprodutibilidade de 5 dias foi feito com as mesmas amostras de origem, em dias consecutivos, com o mesmo kit de reagentes e por operadores diferentes. O coeficiente de variação da concentração de ácidos nucleicos extraídos foi inferior a 5%.

- Estabilidade do **DNA** extraído:

Condições de armazenamento	Estabilidade de RNA/DNA
-80°C	Mais de 90 dias
-20°C	28 dias
4°C	14 dias
25°C	2 dias
Congelamento - Descongelamento	10 vezes

ANOTAÇÕES



ANOTAÇÕES

