



PI-CLEAR
nucleic acid purification kit

Pi-Clear nucleic acid purification kit - Total
RNA

Instruções de uso

Research Use Only (RUO)

Índice

1. Conteúdo e Armazenamento do Kit.....	2
2. Envio e Armazenamento.....	2
3. Uso do produto.....	2
4. Finalidade.....	2
5. Princípios de Ação.....	2
6. Conteúdo do Kit.....	3
7. Equipamentos e Insumos Operacionais.....	3
8. Amostras Biológicas.....	4
9. Cuidados Especiais.....	4
10. Armazenamento de RNA Purificado.....	5
11. Observações.....	5
12. Preparo das Soluções de Trabalho.....	6
13. Extração de RNA de Células.....	6
13.1 Lise das Amostras Celulares.....	6
13.2 Ligação.....	7
13.3 Lavagem.....	8
13.4 Eluição.....	8
14. Extração de RNA de Tecidos Animais.....	8
14.1 Ruptura do Tecido.....	8
14.2 Lise das Amostras Teciduais.....	9
14.3 Ligação.....	9
14.4 Lavagem.....	10
14.5 Eluição.....	10
15. Tratamento do RNA com DNase I.....	10

1. Conteúdo e Armazenamento do Kit

Tipos de kits: *Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit - Total RNA* possui duas apresentações:

Produto	Quantidade
Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit	50 extrações
	250 extrações

2. Envio e Armazenamento

Todo o conteúdo do *Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit - Total RNA* é enviado em temperatura ambiente (15-25 °C).

Após o recebimento, armazenar todo o conteúdo em temperatura ambiente (15-25 °C).

3. Uso do produto

Apenas para uso em pesquisa (RUO).

4. Finalidade

Produto desenvolvido para a extração e purificação de RNA de uma ampla variedade de fontes, incluindo células e tecidos de amostras de animais. O RNA obtido pode ser utilizado para variadas aplicações como PCR, RT-PCR, hibridização, sequenciamento, etc.

5. Princípios de Ação

O *Pi-Clear Nucleic Acid Purification kit - Total RNA* foi desenvolvido para extração e purificação de RNA de amostras biológicas. O método utilizado é a extração por membrana de sílica (coluna). O processo é realizado em 4 etapas:

- 1) Lise celular: rompimento celular para liberação do RNA, na presença de sais de guanidina e, posterior adição de etanol.
- 2) Ligação: ligação seletiva do RNA à membrana de sílica, à qual o RNA se liga.
- 3) Lavagem: retirar as impurezas residuais, através de lavagens subsequentes.
- 4) Eluição: liberação do ácido nucleico da membrana de sílica, com água livre de RNase.

No final do processo, temos o RNA concentrado e com alta pureza.

6. Conteúdo do Kit

Os componentes incluídos no *Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit - total RNA* estão listados abaixo.

Componentes <i>Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit</i>	Quantidade
	50 extrações
Tampão de lise - TL	15 mL
Tampão de Lavagem 1 – TP1	50 mL
Tampão de Lavagem 2 – TP2	ATENÇÃO: Devem ser adicionados 80 mL de Etanol 96-100 % Volume Final: 100 mL
Água livre de RNase – PB3	15 mL
Colunas – PB1	50 unidades (coluna + tubo de coleta)
Tubo coletor (1,5 mL) – PB2	50 unidades

7. Equipamentos e Insumos Operacionais

Materiais contidos no kit:

- Reagentes descritos no item “Conteúdo do Kit”.

- Instrução de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1 - Etanol 96-100%;
- 2 - Micropipetas e ponteiros estéreis com filtro (0,5-10 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L);
- 3 – Microtubos estéreis, livres de RNase e DNase.
- 4 – Microcentrífuga;
- 5 - Agitador Vórtex;
- 6 - Equipamento de Proteção Individual (luvas, jaleco, óculos);
- 7 – No caso de tecidos animais, pode ser necessário o uso de pistilos e almofarizes, ou de trituradores;

8. Amostras Biológicas

Kit para extração de RNA de amostras de células e tecidos de amostras animais. As amostras devem ser coletadas e armazenadas de acordo com as recomendações do laboratório para testes moleculares.

9. Cuidados Especiais

- Procedimentos de biologia molecular, tais como a extração de RNA, transcrição reversa, amplificação e detecção, requerem pessoal qualificado para evitar o risco de resultados errados, especialmente devido à degradação de RNA contido nas amostras ou contaminação da amostra por produtos de amplificação.
- Utilize materiais plásticos estéreis e descartáveis.
- Use apenas ponteiros e tubos de microcentrífuga para pipetas estéreis e descartáveis, livres de RNase e DNase.
- Use luvas descartáveis, sem talco, ao manusear reagentes e amostras biológicas, para evitar a contaminação por RNase/DNase da superfície da pele. Troque as luvas com frequência, em especial à medida que o protocolo progride de material bruto para material purificado.

- Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de melhores resultados.
- Recomendamos aplicar as 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.
- Para obtenção de informações relacionadas à biossegurança ou em caso de acidentes com o produto, consultar as FISPQ (Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos) disponibilizadas no site www.pi-biotech.com.
- O Tampão de Lise contém sais de guanidina, que é prejudicial quando em contato com a pele, ou quando é inalado ou ingerido.
- Não adicione água sanitária (hipoclorito de sódio) ou soluções ácidas diretamente em resíduos de preparação de amostras, pois devido à presença de sais de guanidina podem ocorrer a formação de gases tóxicos e componentes reativos.

10. Armazenamento de RNA Purificado

Armazene o RNA purificado eluído a -20 °C, se for utilizar o material dentro de algumas horas de isolamento. Para armazenamento de longo prazo, armazene o RNA purificado a -70°C.

11. Observações:

- A quantidade de Tampão de Lise necessária pode variar conforme a quantidade de material inicial, bem como com o tipo de amostra.
- Volume de eluição: o rendimento de RNA depende do tipo, tamanho e qualidade da amostra. Dependendo do seu rendimento esperado e da sua amostra, use entre 30 µL– 100 µL de Água livre de RNase para cada eluição.

12. Preparo das Soluções de Trabalho

Preparar o Tampão de Lavagem 2 (TP2), conforme mostrado na tabela abaixo:

Reagente	Preparo
	50 extrações
Tampão de Lavagem 2 (TP2)	Adicionar 80 mL de etanol 96-100%. Homogeneizar a solução.

13. Extração de RNA de Células

O protocolo foi desenvolvido para purificar amostras com volume de 200 µL. Para volumes diferentes, os protocolos devem ser ajustados proporcionalmente.

Antes de iniciar o procedimento, assegure o preparo do Tampão de Lavagem 2 (TP2), descrito no *item 12* e de álcool 70%.

13.1 *Lise das Amostras Celulares*

Realizar as etapas de lise da amostra, conforme tipo de amostra:

Tipo de Amostra	Procedimento
Células em suspensão $\leq 1,0 \times 10^6$	<ul style="list-style-type: none"> - Transferir as células para um microtubo estéril, livre de RNase e DNase. - Centrifugar a 2.000 × g por 5 minutos. - Descartar o meio de crescimento do microtubo. - Ressuspender as células em 200 µL de tampão PBS. - Adicionar 200 µL do Tampão de Lise (TL). - Homogeneizar em vórtex, até que o pellet de células esteja completamente disperso. - Adicionar 400 µL de etanol 70%. - Homogeneizar em vórtex. - Prosseguir para a etapa de Ligação.

Tipo de Amostra	Procedimento
<p>Células em monocamada $\leq 1,0 \times 10^6$</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Remover o meio de crescimento celular. - Adicionar 200 μL do Tampão de Lise (TL) ou quantidade suficiente para cobrir toda a superfície celular. - Homogeneizar lentamente a garrafa ou placa de cultura. - Manter em temperatura ambiente por 03 minutos. - Transferir todo o lisado para um microtubo estéril, livre de RNase e DNase. - Centrifugar a 2.000 \times g por 5 minutos a 4°C. - Recolher o sobrenadante e transferir para um novo microtubo estéril, livre de RNase e DNase. - Adicionar 400 μL de etanol 70%. - Homogeneizar em vórtex. <p>Prosseguir para a etapa de Ligação.</p>

Tipo de Amostra	Procedimento
<p>Pellet Celular $\leq 1,0 \times 10^6$</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionar 200 μL do Tampão de Lise (TL) ao pellet celular. - Homogeneizar em vórtex, até que o pellet de células esteja completamente disperso. - Adicionar 400 μL de etanol 70%. - Homogeneizar em vórtex. - Prosseguir para a etapa de Ligação.

13.2 Ligação

- A - Transferir 700 μ L da amostra lisada para a coluna (**PB1**).
- B - Centrifugar por 1 minuto a 6.800 \times g.
- C - Descartar o filtrado.

D - Repetir os passos **A-C** até esgotar toda a amostra.

13.3 Lavagem

E - Adicionar 700 µL de Tampão de Lavagem 1 (**TP1**).

F - Centrifugar por 15 segundos a 12.000 x g.

G - Descartar o filtrado.

H - Adicionar 500 µL de Tampão de Lavagem 2 (**TP2**).

I - Centrifugar por 1 minuto a 6.800 x g.

J - Descartar o filtrado.

K - Repetir os passos **H-J**.

L - Centrifugar por 2 minutos a 12.000 x g, para secar totalmente a coluna.

M - Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para um tubo coletor (**PB2**).

13.4 Eluição

N - Adicionar 30-100 µL de Água Livre de RNase (**PB3**).

O - Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.

P - Centrifugar por 2 minutos a 12.000 x g e descartar a coluna.

Q - Armazenar o RNA eluído a -20 °C, caso não seja utilizado imediatamente.

Para longos períodos de armazenamento é recomendado estocar a -70 °C.

14. Extração de RNA de Tecidos Animais

O protocolo foi desenvolvido para purificar amostras de tecido animal fresco ou congelado em nitrogênio, com, no máximo, 200 mg por extração.

Antes de iniciar o procedimento, assegure o preparo do Tampão de Lavagem 2 (TP2), descrito no *item 12* e de álcool 70%.

14.1 Ruptura do Tecido

A ruptura do tecido pode ser feita utilizando almofarizes e pistilos, ou trituradores/homogeneizadores eletrônicos:

- No caso da utilização de tecidos frescos, a ruptura deve ser realizada na presença do Tampão de Lise (**TL**).
- No caso de tecidos congelados, a ruptura deve ser realizada previamente e, em seguida, adicionado o Tampão de Lise (**TL**).
- No caso de tecidos fibrosos, congelar o tecido em nitrogênio líquido, triturar e, em seguida, após evaporação do nitrogênio, adicionar o Tampão de Lise (**TL**) ao pó de tecido.

A ruptura rápida e completa do tecido durante a lise é importante para evitar a degradação do RNA.

14.2 Lise das Amostras Teciduais

A - Transferir o tecido para um microtubo estéril, livre de RNase e DNase.

B - Adicionar quantidade de Tampão de Lise (**TL**), conforme o peso da amostra:

Peso (mg)	Volume de Tampão de Lise (TL)
≤5,0 mg	300 µL
5,0 – 50,0 mg	500 µL
50,0 – 200,0 mg	500 µL a cada 50,0 mg

C - Proceder a ruptura do tecido, caso ainda não esteja triturado (*ver item 14.1*).

D - Centrifugar a 12.000 x g por 2 minutos.

E - Recolher o sobrenadante em um microtubo estéril, livre de RNase e DNase.

F - Adicionar 1,5 o volume do tecido lisado de etanol 100%.

G - Homogeneizar em vórtex.

H - Prosseguir para a etapa de **Ligação**.

14.3 Ligação

I - Transferir 700 µL da amostra lisada para a coluna (**PB1**).

J - Centrifugar por 1 minuto a 6.800 x g.

K - Descartar o filtrado.

L - Repetir os passos **I-K** até esgotar toda a amostra.

14.4 Lavagem

M - Adicionar 700 µL de Tampão de Lavagem 1 (**TP1**).

N - Centrifugar por 15 segundos a 12.000 x g.

O - Descartar o filtrado.

P - Adicionar 500 µL de Tampão de Lavagem 2 (**TP2**).

Q - Centrifugar por 1 minuto a 6.800 x g.

R - Descartar o filtrado.

S - Repetir os passos **P-R**.

T - Centrifugar por 2 minutos a 12.000 x g, para secar totalmente a coluna.

U - Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para um tubo coletor (**PB2**).

14.5 Eluição

V - Adicionar 30-100 µL de Água Livre de RNase (**PB3**).

W - Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.

X- Centrifugar por 2 minutos a 12.000 x g e, em seguida, descartar a coluna.

Y - Armazenar o RNA eluído a -20 °C, caso não seja utilizado imediatamente.

Para longos períodos de armazenamento é recomendado estocar a -70 °C.

15. Tratamento do RNA com DNase I

A extração de RNA com *Pi-Clear Nucleic Acid Purification Kit – Total RNA* pode conter traços de DNA. Para a obtenção de amostra totalmente livre de DNA, recomendamos o uso de kits de DNase I, grau de amplificação, disponíveis comercialmente. No entanto, isso pode resultar em rendimento reduzido de RNA.