

## Pi-Clear nucleic acid purification kit - Total RNA

**ATENÇÃO:** Antes de iniciar o teste, ler atentamente o item "Cuidados especiais" na Instrução de Uso do produto.

Item	Apresentação
Colunas – PB1	50 unidades (coluna + tubo de coleta)
Tampão de Lise – TL	15 mL
Tampão de Lavagem 1 – TP1	50 mL
Tampão de Lavagem 2 – TP2	<b>ATENÇÃO:</b> Devem ser adicionados 80 mL de Etanol 96-100 % Volume Final: 100 mL
Tubo coletor (1,5 mL) – PB2	50 unidades
Água Livre de RNase – PB3	15 mL

Armazenamento dos itens: temperatura ambiente (15 - 25 °C)

**Itens adicionais:** Além dos itens que compõem o kit, para realizar as extrações é necessário ter Etanol 96-100% e microtubos livres de DNase e RNase extras.

**Procedimento validado para:** células em suspensão (em PBS), células em monocamada, pellet celular ( $\leq 1,0 \times 10^6$ ) e tecido animal.

### Procedimento

#### A) Lise das amostras

- 1 Adicionar amostra em um microtubo limpo, estéril e livre de DNase e RNase;  
Obs: preparar a amostra conforme descrito nas Instruções de Uso do produto;
- 2 Adicionar 200  $\mu$ L de Tampão de Lise (TL) e homogeneizar;
- 3 Adicionar 400  $\mu$ L de Etanol 70% e homogeneizar.



+ 200  $\mu$ L TL  
Homogeneizar  
+ 400  $\mu$ L Etanol 70%  
Homogeneizar

Amostra

## Extração e Purificação de ácidos nucleicos

### B) Ligação

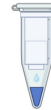
- 4 Transferir 700 µL da amostra lisada para a coluna (**PB1**);
- 5 Centrifugar por 1 minuto a 6.800 x g;
- 6 Descartar o filtrado;
- 7 Repetir os passos 4-6 até esgotar toda a amostra.



Transferir amostra para **PB1**  
1 min. 6.800 x g  
↻

### C) Lavagem

- 8 Adicionar 700 µL de Tampão de Lavagem 1 (**TP1**);
- 9 Centrifugar por 15 segundos a 12.000 x g;
- 10 Descartar o filtrado;
- 11 Adicionar 500 µL de Tampão de Lavagem 2 (**TP2**);
- 12 Centrifugar por 1 minuto a 6.800 x g;
- 13 Descartar o filtrado;
- 14 Repetir os passos 11-13;
- 15 Centrifugar por 2 minutos a 12.000 x g, para secar totalmente a coluna;
- 16 Descartar o tubo de coleta e transferir a coluna para um tubo coletor (**PB2**).



+ 700 µL **TP1**  
15 s 12.000 x g  
↻  
+ 500 µL **TP2**  
1 min 6.800 x g  
↻  
+ 500 µL **TP2**  
1 min 6.800 x g  
↻  
2 min 12.000 x g  
↻

### D) Eluição

- 17 Adicionar 30-100 µL de Água Livre de RNase (**PB3**);
- 18 Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto;
- 19 Centrifugar por 2 minutos a 12.000 x g e descartar a coluna;
- 20 Armazenar o DNA/RNA eluído a -20 °C, caso não seja utilizado imediatamente. Para longos períodos de armazenamento é recomendado estocar a -70 °C.



30-100 µL **PB3**  
1 min TA  
2 min 12.000 x g  
↻