

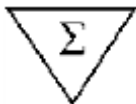


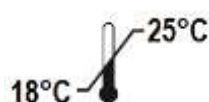
Integra RNA/DNA extraction kit

*Estrazione di acidi nucleici con Spin columns
da multiple tipologie di campioni
Nucleic acids extraction with Spin columns
from multiple kind of samples*

SISTEMA DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI
NUCLEIC ACIDS EXTRACTION SYSTEM

***Istruzioni per uso
Instructions for users***

REF	EXMB001-50	EXMB001-200
 Σ n	50	200



EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

INDICE

1) INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION	pag. 2/9
1.1 Destinazione di uso/ <i>Intended use</i>	
1.2 Principio di funzionamento/ <i>Principle</i>	
2) CONTENUTO DEL KIT/KIT CONTENTS	pag. 2/9
3) ISTRUZIONI PER LO STOCCAGGIO/STORAGE INSTRUCTIONS	pag. 3/9
4) MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI/UNPROVIDED MATERIALS	pag. 3/10
5) AVVERTENZE E PRECAUZIONI/WARNING AND PRECAUTIONS	pag. 3/10
6) PROCEDURA OPERATIVA/OPERATING PROCEDURE	pag. 4/11
6.1 Preparazione dei reagenti/ <i>Reagents preparation</i>	
6.2 Procedura/ <i>Procedure</i>	
6.2.1 Estrazione di DNA e RNA genomico/ <i>Genomic DNA/RNA extraction</i>	
6.2.2 Estrazione di DNA da latte crudo e latte mastitico/ <i>DNA from Milk</i>	
7) INFORMAZIONI TECNICHE/TECHNICAL INFORMATION	pag. 7/13
7.1 Controllo di qualità/ <i>Quality control</i>	
7.2 Tempo di preparazione/ <i>Preparation time</i>	
8) TROUBLESHOOTING	pag. 8/14
9) SIMBOLI/SYMBOLS	pag. 11

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

1. INFORMAZIONI GENERALI

1.1 Destinazione di uso

GENESPAK INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT è progettato per la purificazione di acidi nucleici da una vasta gamma di campioni difficili (ad es. campioni umani e veterinari, insetti, ecc.). Il kit può essere usato in particolare per l'estrazione di acidi nucleici da matrici difficili (ad esempio fecce bovini o feci da piccoli ruminanti). Gli acidi nucleici purificati vengono applicati in PCR o RT-PCR direttamente dopo l'eluizione in acqua di grado PCR.

1.2 Principio di funzionamento

GENESPAK INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT è progettato per l'analisi degli acidi nucleici mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR) o RT-PCR, in cui è necessario l'isolamento dell'analita da vari materiali del campione. A tal fine, il campione viene liscio mediante incubazione in un buffer di lisi proprietario. In presenza di un sale chaotropico, gli acidi nucleici si legano specificamente alla superficie delle fibre di vetro con **Integra** Spin Columns. Specificamente legato alle fibre di vetro, gli acidi nucleici possono essere purificati da sali, proteine e altri componenti presenti nel campione lavando con **Integra** Inhibitor Removal e Wash Buffers:

1. I campioni sono lisati dall'incubazione in **Integra** Binding Buffer. Gli acidi nucleici sono legati alle fibre di vetro all'interno delle **Integra** Spin Columns.
2. Gli acidi nucleici legati vengono lavati con **Integra** Inhibitor Removal Buffer per rimuovere gli inibitori PCR dal campione come > 100 U/ml di eparina.
3. Gli acidi nucleici legati vengono lavati con **Integra** Wash Buffer per purificarli da sali, proteine e altre impurità cellulari.
4. Gli acidi nucleici purificati vengono eluiti dal **Integra** Spin Columns con **Integra** Elution Buffer.

2. CONTENUTO DEL KIT

INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT (REF EXBM001-50) può eseguire 50 estrazioni.

INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT (REF EXBM001-200) può eseguire 200 estrazioni.

Table 1 – Contenuto del kit

CODICE	EXBM001-50	EXBM001-200
PV1 Binding buffer	1x21 ml + 9 ml 2-propanolo	2x40 ml + 17 ml 2-propanolo
PA Poly A	1 mg	4 mg
P2 Inhibitor Removal buffer	1x16.5 ml + 10 ml etanolo assoluto	2x33 ml + 20 ml etanolo assoluto
P3 Wash buffer	1x10 ml + 40 ml etanolo assoluto	2x20 ml + 80 ml etanolo assoluto
P4 Elution buffer	1x45 ml	1x12
Columns	50 pezzi	200 pezzi

Tutte le soluzioni sono chiare e non dovrebbero essere utilizzate quando si formano precipitazioni. Scaldare le soluzioni a +18 a + 25°C o in un bagno d'acqua di 37°C fino a quando i precipitati si sono sciolti.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

3. ISTRUZIONI PER LO STOCCAGGIO

Tutti i componenti di **GENESPARK INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT** devono essere conservati a +18 a +25°C. Se vengono conservati correttamente, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza stampata sull'etichetta. Si prega di notare che lo stoccaggio improprio a +2 a +8°C (frigorifero) o da -15 a -25°C (congelatore) influenzerà negativamente la purificazione dell'acido nucleico quando si formano precipitazioni nelle soluzioni. Quindi i kit **Integra** vengono sempre spediti a +18 a + 25°C.

La soluzione di Lavoro Poly A carrier RNA ricostituito deve essere aliquotato. Le aliquote sono stabili per 12 mesi se conservate a ≤-18°C.

4. MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

- Acqua per PCR
- Consigli di pipetta sterili con filtro
- Tubi di raccolta senza nucleasi (Immunospark G06008)
- Tubo di microcentrifuga da 1,5 ml o 2,0 ml senza nucleasi
- Microcentrifuga da tavolo in grado di raggiungere una forza centrifuga di 13.000 x g
- etanolo assoluto
- 2-propanolo
- Termoblocco o forno da laboratorio (solo per l'isolamento del DNA)

5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Questo Kit deve essere usato solo da personale qualificato.
2. Good Laboratory Practice (GLP) devono essere applicate.
3. I campioni devono sempre essere considerati come materiale potenzialmente infettivo e tutti gli strumenti utilizzati devono essere trattati come potenzialmente contaminati.
4. Il buffer di rilascio integrato e il buffer di rimozione degli inibitori contengono guanidina idrocloridata che è un irritante. Indossare sempre guanti e seguire le precauzioni di sicurezza per minimizzare il contatto durante la movimentazione. Non usare candeggianti per il trattamento dei residui!
5. Non permettere il contatto dei tamponi con la pelle, gli occhi o le mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente l'area interessata con grandi quantità di acqua; può causare ustioni. Se si sversa il reagente, diluire la fuoriuscita con acqua prima di pulirla.
6. Non conservare o utilizzare i tamponi nei pressi di cibo umano o animale.
7. Indossare sempre i guanti e seguire le precauzioni di sicurezza standard.
8. Esercitare le normali precauzioni necessarie per la manipolazione di tutti i reagenti.
9. Non raccogliere reagenti da lotti diversi o da bottiglie diverse dello stesso lotto. Immediatamente dopo l'uso, chiudere tutte le bottiglie per evitare perdite, variazioni di concentrazioni di tamponi o condizioni di tampone. Dopo la prima apertura conservare tutte le bottiglie in posizione verticale.
10. Non utilizzare un kit dopo la data di scadenza.
11. Non utilizzare etanolo modificato.
12. Utilizzare solo pipette calibrate
13. Non mangiare, bere o fumare nell'area di lavoro del laboratorio.
14. Non pipettare per bocca.
15. Indossare guanti monouso protettivi, indumenti di laboratorio e protezione degli occhi quando si manipolano i campioni e reagenti del kit.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

 Info: sales@immunospark.com

16. Evitare la contaminazione microbica e nucleasi dei reagenti quando si rimuove le aliquote dalle bottiglie di reagenti.
17. Si raccomanda l'uso di pipette sterilizzabili.
18. Lavare le mani accuratamente dopo aver prelevato campioni e reagenti di prova.
19. Smaltire i reagenti non utilizzati e i rifiuti dovrebbero essere eseguiti in conformità con i regolamenti nazionali, federali e locali.
20. Le schede di sicurezza dei materiali (MSDS) sono disponibili su richiesta da Immunospark.

6. PROCEDURA OPERATIVA
6.1 Preparazione dei reagenti

Nella tabella seguente sono riassunte le condizioni di preparazione dei vari componenti della procedura e le conseguenti condizioni di conservazione:

Table 2 – Preparazione reagenti

CODICE	Ricostituzione/Preparazione		Conservazione e stabilità	Scopo
	EXBM001-50	EXBM001-200		
Poly A (PA)	Dissolvere in 0,25 ml di Elution Buffer e preparare aliquote da 50 ul.	Dissolvere in 1,00 ml di Elution Buffer e preparare aliquote da 50.	Conservare le aliquote a $\leq -18^{\circ}\text{C}$, stabile per 12 mesi.	Additivo del binding buffer.
Binding Buffer (PV1)	Aggiungere 9 ml 2-propanol Binding Buffer e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia.	Aggiungere 17 ml 2-propanol Binding Buffer e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia.	Conservare a $+18^{\circ}\text{C}$ - 25°C . stabile fino alla scadenza.	Lisi delle cellule
Inhibitor Removal Buffer (P2)	Aggiungere 10 ml di etanolo assoluto al Buffer di rimozione dei residui e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia	Aggiungere 20 ml di etanolo assoluto al Buffer di rimozione dei residui e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia	Conservare a $+18^{\circ}\text{C}$ - 25°C . stabile fino alla scadenza.	Rimozione degli inibitori di PCR dagli acidi nucleici.
Wash Buffer (P3)	Aggiungere 40 ml di etanolo assoluto al Wash Buffer e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia	Aggiungere 80 ml di etanolo assoluto al Wash Buffer e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia	Conservare a $+18^{\circ}\text{C}$ - 25°C . stabile fino alla scadenza.	Rimozione Sali, proteine e altre impurezze dagli acidi nucleici.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

 Info: sales@immunospark.com

È possibile purificare i campioni di DNA da un'ampia gamma di sorgenti di campione:

Tabella 3 – possibili sorgenti di campione

Tipo di campione	Volume/Quantità	Volume Binding Buffer	Pretrattamento del campione
Feci	Pea-size	500 ul	Preparare una sospensione in 1.5 ml di dH2O sterile. Vortexare e filtrare i sedimenti. Usare 200 ul di surnatante.
Tampone		500 ul	
Campioni liquidi*	200 ul	500 ul	
Tessuto	≤ 30 mg	500 ul	Omogeneizzazione del tessuto in Binding Buffer.
Tessuto	≤ 2x10 ⁶ cells	500ul	Raccogliere fino a 2 x 10 ² cells. Risospingere il pellet in Binding Buffer.
Latte	100 ul	600**ul	**Diluzione di 100 ul di latte in 600 ul di soluzione di lavoro (500 ul PV1 supplementato con 100 ul di sample preparation buffer SPM)

*EDTA-sangue, siero, fluido amniotico, CSF, urina, acqua, etc.

6.2 Procedura

Le procedure seguenti sono per la preparazione di acidi nucleici da 200 µl di volume di campione. Se si utilizzano volumi di campione maggiori (fino a 300 µl) o altre matrici di campioni, fare riferimento alla tabella 3 per i volumi appropriati di buffer.

I campioni contenenti precipitati devono essere centrifugati prima della purificazione!

Conservare l'RNA eluito a ≤ 65 ° C e il DNA eluito a ≤ -18 ° C per ulteriori analisi.

6.2.1 Estrazione di DNA e RNA genomico

Questo protocollo deve essere seguito se necessario per estrarre contemporaneamente DNA genomico, DNA virale e RNA, DNA batterico o DNA e RNA. Si raccomanda l'isolamento simultaneo di DNA (batterico o virale) e RNA virale se si intende utilizzare eluati, ad es. per i PCR multiplex in tempo reale (RT-) per la rilevazione di entrambi gli agenti patogeni con genoma del DNA e virus RNA. Per l'isolamento (simultaneo) del DNA e / o dell'RNA virale da materiale del campione liquido, seguire il protocollo sottostante, per l'isolamento di DNA e / o RNA virale da altri tipi di campioni o matrici di campioni complessi, fare riferimento alla panoramica riportata nella Tabella 3 o contattaci.

Prima di iniziare preparare una soluzione di lavoro del buffer di legame (PV1) integrato con poli A ricostituito (PA) per almeno un campione (N) più di quanto necessario per compensare la schiumatura del tampone.

Tabella 4 – Preparazione delle soluzioni di Lavoro di DNA e RNA.

Volume necessario per campione	Soluzione di lavoro della mastermix
500 ul Binding Buffer (PV1) 4 ul Poly A (PA)	500 ul x (N+1) 4 ul x (N+1)

Preriscaldare (60°C) la Elution Buffer (P4) può aumentare il risultato in DNA.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

Step 1

- Aggiungere 200 µl di campione ad un tubo di microcentrifuga da 2,0 ml senza nucleasi.
- Aggiungere una soluzione di lavoro di 500 µl, preparata al momento.
- Mescolare immediatamente.
- Per l'isolamento DNA / RNA incubare per 60 min a 60 ° C. Se solo l'RNA virale deve essere estratto, il passo può essere omissso.

Step 2

- Pipettare l'intera miscela nel serbatoio della colonna Integra Spin.
- Centrifuga 1 min a 8.000 × g.
- Rimuovere la colonna Integra Spin dal tubo di raccolta, scartare il liquido fluido e eventualmente il tubo raccolta.
- Facoltativamente, sostituire il tubo di raccolta.

Step 3

- Aggiungere 500 µl di Tampone di Rimozione Inibitore (P2) nel serbatoio della colonna Integra.
- Centrifugare 30 s a 8.000 × g.
- Rimuovere la colonna Integra Spin dal tubo di raccolta, scartare il liquido fluido e eventualmente il tubo raccolta.
- Facoltativamente, sostituire il tubo di raccolta.

Step 4

- Aggiungere 450 µl di Tampone di Lavaggio (P3) nel serbatoio della colonna Integra Spin.
- Centrifugare 30 s a 8.000 × g.
- Rimuovere la colonna Integra Spin dal tubo di raccolta, scartare il liquido fluido e eventualmente il tubo raccolta.
- Facoltativamente, sostituire il tubo di raccolta.
- Facoltativo *: Aggiungere il serbatoio di lavaggio 450 µl (P3) nel serbatoio della colonna Integra Spin.
- Centrifugare 30 s a 8.000 × g.
- Centrifugare 10 s alla velocità massima (13.000 × g) per rimuovere completamente l'etanolo dalla colonna.

Step 5

- Trasferire la colonna Integra Spin in un tubo di microcentrifuga da 1,5 ml senza nucleasi.
- Aggiungere 20-50 µl (opzionale: preriscaldato [60 ° C]) del buffer di eluizione (P4) nel serbatoio della colonna Integra Spin.
- Facoltativo: Incubare per 1 min a temperatura ambiente.
- Centrifuga 1 min a 8.000 × g.
- L'eluato contiene acido nucleico purificato.

* Per materiali complessi, come il sangue intero o le feci, un ulteriore pasto di lavaggio con il Tampone di lavaggio (P3) può aumentare la purezza dell'acido nucleico.

6.2.2 Estrazione di DNA da latte crudo o latte mastitico

Materiali addizionali necessari:

- Sample Preparation Buffer SPM

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

Prima di iniziare, preparare una soluzione di lavoro del buffer di rilascio (PV1) integrato con polimero ricostituito (PA) e tampone di preparazione del campione SPM per almeno un campione (N) più di quanto necessario per compensare la schiumatura del tampone.

Tabella 5 – Preparazione di soluzioni di Lavoro per estrazione di DNA e RNA da Latte.

Volume necessario per campione	Soluzione di lavoro della mastermix
500 ul Binding Buffer (PV1)	500 ul x (N+1)
4 ul Poly A (PA)	4 ul x (N+1)
100 ul Samples Preparation Buffer	100 ul (N+1)

Step 1

- Aggiungere una soluzione di lavoro di 600 µl, appena preparata in un tubo di microcentrifuga da 2,0 ml senza nucleasi.
- Aggiungere ogni campione 100 µl di campione.
- Mescolare immediatamente.
- Eseguire la digestione per 30 minuti a 60 ° C.
- Dopo l'incubazione di lisi, centrifuga per 5 sec al max. velocità per raccogliere qualsiasi campione dai coperchi del tubo di lisi.

Step 2 e seguenti vedere 6.2.1 estrazione di DNA e RNA genomico.

7. INFORMAZIONI TECNICHE

7.1 Controllo di qualità

In accordo con le procedure ISO di Immunospark, ogni lotto del kit **Integra** è testato in base a specifiche prestabilite per garantire una qualità costante del prodotto.

Le serie di diluizione di MS2 RNA, DNA di Lambda-Phage e DNA genomico umano vengono applicate alle colonne Integra Spin, lavate ed eluite secondo il protocollo del kit. 4 µl dell'elua viene analizzato in tempo reale (RT-) PCR. Sono garantiti il recupero di almeno 2 x 10⁵ RNA o molecole di DNA per 200 µl di campione.

Per la convalida del RNA virale di **Integra**, DNA genomico, DNA virale e DNA batterico sono stati isolati da un'ampia gamma di matrici di campioni quali sangue, tessuti, feci, zecche, latte, tampone buccale ecc.

Gli elluati sono stati utilizzati come template in RT-PCR in tempo reale e hanno prodotto prodotti PCR altamente specifici con buone rese.

7.2 Tempo di preparazione

Il tempo di preparazione necessario dipende sempre dal numero di campioni da preparare.

Table 6 – Tempi di preparazione.

	DNA/RNA	Viral RNA
Tempo totale	Approx. 70 minuti	Approx. 10 minuti
Tempo manualità	Meno di 10 minuti	Meno di 10 minuti

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

8. TROUBLESHOOTING

La seguente guida per la risoluzione dei problemi è inclusa per aiutarti con eventuali problemi che possono sorgere durante l'isolamento dell'acido nucleico da diversi tipi di materiale di campionamento. Soprattutto quando si lavora con matrici di campioni complessi come tessuto adiposo, sangue intero o campioni altamente contaminati, la preparazione di campioni può essere cruciale. Per i protocolli sui materiali di campione non contemplati nel presente manuale o per ulteriori domande sull'isolamento di acido nucleico, non esitate a contattarci.

Low nucleic acid yield or purity	
Kit stored under non-optimal conditions.	Store kit at +18 to +25°C at all times upon arrival.
Buffers or other reagents were exposed to conditions that reduced their effectiveness	Store all buffers at +18 to +25°C. Close all reagent bottles tightly after each use to preserve pH and stability and to prevent contamination. Aliquot Poly A (PA) after reconstitution and store aliquots at ≤-18°C.
2-propanol not added to Binding Buffer (PV1)	Add 2-propanol to the buffer before using. After adding 2-propanol, mix the buffers well and store at +18 to 25°C. Always mark the buffer vial to indicate whether 2-propanol has been added or not.
Ethanol not added to Inhibitor Removal Buffer (P2) and/or Wash Buffer (P3)	Add absolute ethanol to the buffers before using. After adding ethanol, mix the buffers well and store at +18 to 25°C. Always mark the buffer vials to indicate whether ethanol has been added or not.
Reagents and samples not completely mixed	Always mix the sample tube well after addition of each reagent.
Impurities not completely removed	Perform a second wash step with Wash Buffer (P3) in order to completely remove salts, proteins and other residual impurities from the bound nucleic acid.
Poor elution of nucleic acids with water	
Water has wrong pH	If you use your own water or buffer to elute nucleic acids from the Integra Spin Column, be sure it has the same pH as the Elution Buffer supplied in the kit.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

1. GENERAL INFORMATION

1.1 Intended use

GENESPARK INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT is designed for the purification of nucleic acids from a wide range of difficult samples (eg human and veterinary samples, insects, etc.). The kit can be used in particular for the extraction of nucleic acids from difficult matrices (for example bovine lees or small ruminant stools). Purified nucleic acids are applied in PCR or RT-PCR directly after elution in PCR grade water.

1.2 Principle

GENESPARK INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT is designed for the analysis of nucleic acids by polymerase chain reaction (PCR) or RT-PCR, where analyte isolation from various sample materials is required. To this end, the sample is smoothed by incubation in a proprietary lysis buffer. In the presence of a chaotropic salt, the nucleic acids bind specifically to the surface of the glass fibers with **Integra** Spin Columns. Specifically bound to glass fibers, nucleic acids can be purified from salts, proteins and other components present in the sample by washing with **Integra** Inhibitor Removal e Wash Buffers:

1. Samples are lysed by incubation in **Integra** Binding Buffer. The nucleic acids are bound to the glass fibers inside the **Integra** Spin Columns.
2. The bound nucleic acids are washed with **Integra** Inhibitor Removal Buffer to remove PCR inhibitors from the sample as > 100 U/ml heparin.
3. The bound nucleic acids are washed with **Integra** Wash Buffer to purify them from salts, proteins and other cellular impurities.
4. Purified nucleic acids are eluted from **Integra** Spin Columns with **Integra** Elution Buffer.

2. KIT CONTENTS

INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT (REF EXBM001-50) can execute 50 extractions.

INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT (REF EXBM001-200) can execute 200 extractions.

Table 1 – Kit contents

REF	EXBM001-50	EXBM001-200
PV1 Binding buffer	1x21 ml + 9 ml 2-propanol	2x40 ml + 17 ml 2-propanol
PA Poly A	1 mg	4 mg
P2 Inhibitor Removal buffer	1x16.5 ml + 10 ml absolute ethanol	2x33 ml + 20 ml absolute ethanol
P3 Wash buffer	1x10 ml + 40 ml absolute ethanol	2x20 ml + 80 ml absolute ethanol
P4 Elution buffer	1x45 ml	1x12
Columns	50 pieces	200 pieces

All solutions are clear and should not be used when precipitation is formed. Heat solutions at +18 to + 25°C or in a 37°C water bath until the precipitates have melted.

3. STORAGE INSTRUCTIONS

All the components of **GENESPARK INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT** they must be stored at +18 to + 25°C. If they are stored correctly, kit components are stable until the

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

expiration date printed on the label. Please note that improper storage at +2 to + 8°C (refrigerator) or -15 to -25°C (freezer) will affect the purification of the nucleic acid when precipitation is formed in the solutions. So the **Integra** kits are always shipped at +18 to + 25°C. The reconstituted Poly A RNA Work Solution should be aliquoted. The aliquots are stable for 12 months if stored at $\leq -18^{\circ}\text{C}$.

4. UNPROVIDED MATERIALS

- Water for PCR
- Sterile pipette tips with filter
- Nuclease-free collection tubes (Immunospark G06008)
- 1.5 ml or 2.0 ml microcentrifuge tube without nuclease
- Table microcentrifuge capable of reaching a centrifugal force of 13,000 x g
- absolute ethanol
- 2-propanol
- Thermoblock or laboratory oven (for DNA isolation only)

5. WARNING AND PRECAUTIONS

1. This Kit should only be used by qualified personnel.
2. Good Laboratory Practice (GLP) must be applied.
3. Samples should be considered as infectious material and equipment as contaminated.
4. The buffers contain hydrochloride guanidine which is an irritant. Always wear gloves and follow safety precautions to minimize contact during handling. Do not use bleaches for waste treatment!
5. Do not store or use buffers near human or animal food.
6. Exercise the normal precautions necessary for the handling of all laboratory reagents.
7. Do not collect reagents from different lots or from different bottles of the same lot. Immediately after use, close all bottles to avoid leakage, changes in buffer concentrations or buffer conditions. After the first opening, keep all the bottles in an upright position.
8. Do not use a kit after the expiration date.
9. Avoid contact of the release buffer and inhibitor removal with skin, eyes or mucous. In case of contact, wash immediately with plenty of water. Possible burns can occur if not treated. If the reagent is leaked, dilute with water before drying it dry.
10. Do not use any modified ethanol.
11. Use only calibrated pipettes
12. All originating materials and all resulting waste should be considered infectious. Clean and disinfect all work surfaces with disinfectants recommended by local authorities.
13. Do not eat, drink or smoke in the laboratory work area.
14. Do not pipette by mouth.
15. Avoid microbial and nuclease contamination of reagents when removing aliquots from reagent bottles.
16. Sterile pipettes are recommended.
17. Wash hands thoroughly after taking samples and test reagents.
18. Dispose of unused reagents and waste should be performed in accordance with national, federal and local regulations.
19. Material Safety Data Sheets (MSDS) are available on request from Immunospark.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

6. OPERATING PROCEDURE

6.1 Reagents preparation

The following table summarizes the conditions for the preparation of the various components of the procedure and the consequent storage conditions:

Table 2 – Reagents preparation

REF	Reconstitution/Preparation		Storage and stability	Scope
	EXBM001-50	EXBM001-200		
Poly A (PA)	Dissolve in 0.25 ml of Elution Buffer and prepare 50 µl aliquote.	Dissolve in 1.00 ml of Elution Buffer and prepare 50 µl aliquote.	Store aliquots at ≤-18 °C, stable for 12 months.	Additive of the binding buffer.
Binding Buffer (PV1)	Add 9 ml 2-propanol Binding Buffer and mix well. Label and date the bottle.	Add 17 ml 2-propanol Binding Buffer and mix well. Label and date the bottle.	Store aliquots at ≤-18 °C, stable for 12 months.	Cells lysis
Inhibitor Removal Buffer (P2)	Add 10 ml 2-propanol Inhibitor Removal Buffer and mix well. Label and date the bottle	Add 20 ml 2-propanol Inhibitor Removal Buffer and mix well. Label and date the bottle	Store aliquots at ≤-18 °C, stable for 12 months.	Removal of the inhibitors of the PCR.
Wash Buffer (P3)	Add 40 ml absolute ethanol Wash Buffer and mix well. Label and date the bottle	Add 80 ml absolute ethanol Wash Buffer and mix well. Label and date the bottle	Store aliquots at ≤-18 °C, stable for 12 months.	Removal of salts, proteins and other impurities from nucleic acids.

DNA samples can be purified from a wide range of sample sources:

table 3 – possible samples

Sample kind	Volume/Quantity	Volume Binding Buffer	Sample pre-treatment
Stool	Pea-size	500 ul	Prepare a suspension in 1.5 ml of sterile dH2O. Vortex and filter the sediments. Use 200 µl of supernatant.
swab		500 ul	
Liquid samples DNA samples can be purified from a wide range of sample sources *	200 ul	500 ul	
Tissue	≤ 30 mg	500 ul	Homogenization of the tissue in Binding Buffer.
Tissue	≤ 2x10 ⁶ cells	500ul	Collect up to 2 x 10 ² cells. Resuspend the pellet in Binding Buffer.
Milk	100 ul	600**ul	**Dilution of 100 ul milk in 600 ul of working solution (500 ul PV1 supplemented with 100 ul of sample preparation buffer SPM)

*EDTA-blood, serum, amniotic fluid, CSF, urine, water, etc.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

6.2 Procedure

The following procedures are for the preparation of 200 µl nucleic acids of sample volume. If larger sample volumes (up to 300 µl) or other sample matrices are used, refer to Table 3 for appropriate buffer volumes.

Samples containing precipitates must be centrifuged before purification!

Store the eluted RNA at ≤ 65 ° C and the eluted DNA at ≤ -18 ° C for further analysis.

6.2.1 Genomic DNA/RNA extraction

This protocol must be followed if necessary to simultaneously extract genomic DNA, viral DNA and RNA, bacterial DNA or DNA and RNA. Simultaneous isolation of DNA (bacterial or viral) and viral RNA is recommended if eluates are to be used, e.g. for real-time multiplex PCR (RT-) for the detection of both pathogens with DNA genome and RNA virus. For the (simultaneous) isolation of DNA and / or viral RNA from liquid sample material, follow the protocol below for the isolation of viral DNA and / or RNA from other types of samples or complex sample matrices, making refer to the overview in Table 3 or contact us.

Before starting, prepare a working solution of the binding buffer (PV1) integrated with reconstituted poly A (PA) for at least one sample (N) more than necessary to compensate the foaming of the buffer.

Table 4 – DNA/RNA working solutions preparation.

Sample needed volume	Working solution of mastermix
500 ul Binding Buffer (PV1)	500 ul x (N+1)
4 ul Poly A (PA)	4 ul x (N+1)

Preheat (60°C) the Elution Buffer (P4) can increase the result of DNA.

Step 1

- Add 200 µL of sample to a 2.0 ml microcentrifuge tube without nuclease.
- Add a work solution of 500 µl, freshly prepared.
- Mix immediately.
- For DNA / RNA isolation, incubate for 60 min at 60 ° C. If only the viral RNA must be extracted, the step can be omitted.

Step 2

- Pipette the entire mixture into the Integra Spin column tank.
- Centrifuge 1 min to 8,000 × g.
- Remove the Integra Spin column from the collection tube, discard the fluid fluid and possibly the collected tube.
- Optionally, replace the collection tube.

Step 3

- Add 500 µl of Inhibitor Removal Buffer (P2) into the Integra column reservoir.
- Centrifuge 30 s at 8,000 × g.
- Remove the Integra Spin column from the collection tube, discard the fluid fluid and possibly the collected tube.
- Optionally, replace the collection tube.

Step 4

- Add 450 µl of Wash Buffer (P3) to the Integra Spin column reservoir.
- Centrifuge 30 s at 8,000 × g.
- Remove the Integra Spin column from the collection tube, discard the fluid fluid and possibly the collected tube.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

- Optionally, replace the collection tube.
- Optional *: Add the 450 µl wash tank (P3) to the Integra Spin column reservoir.
- Centrifuge 30 s at 8,000 × g.
- Centrifuge 10 s at maximum speed (13,000 × g) to completely remove ethanol from the column.

Step 5

- Transfer the Integra Spin column to a 1.5 ml microcentrifuge tube without nuclease.
- Add 20-50 µl (optional: preheated [60 ° C]) of the elution buffer (P4) to the Integra Spin column reservoir.
- Optional: Incubate for 1 min at room temperature.
- Centrifuge 1 min to 8,000 × g.
- The eluate contains purified nucleic acid.

* For complex materials, such as whole blood or feces, an additional wash meal with Wash Buffer (P3) can increase the purity of the nucleic acid.

6.2.2 DNA extraction from raw milk

Additional materials needed:

- Sample Preparation Buffer SPM

Before starting, prepare a working solution of the release buffer (PV1) integrated with reconstituted polymer (PA) and SPM sample preparation buffer for at least one sample (N) more than necessary to compensate the foaming of the buffer.

Table 5 – DNA/RNA working solutions preparation for extraction from raw milk.

Needed volume per sample	Mastermix working solution
500 ul Binding Buffer (PV1)	500 ul x (N+1)
4 ul Poly A (PA)	4 ul x (N+1)
100 ul Samples Preparation Buffer	100 ul (N+1)

Step 1

- Add a working solution of 600 µl, freshly prepared in a 2.0 ml microcentrifuge tube without nuclease.
- Add 100 µl of sample to each sample.
- Mix immediately.
- Digestion for 30 minutes at 60 ° C.
- After lysis incubation, centrifuge for 5 seconds at max. speed to collect any sample from the lysis tube lids.

Step 2 and **sequenti** see 6.2.1 genomic DNA/RNA extraction.

7. TECHNICAL INFORMATIONS

7.1 Quality control

In accordance with the Immunospark ISO procedures, each batch of the Integra kit is tested according to pre-established specifications to ensure consistent product quality.

The dilution series of MS2 RNA, Lambda-Phage DNA and human genomic DNA are applied to Integra Spin columns, washed and eluted according to the kit protocol. 4 µl of the eluate is analyzed in real time (RT-) PCR. Recovery of at least 2 x 10⁵ RNA or DNA molecules for 200 µl of sample is guaranteed.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

For the validation of Integra viral RNA, genomic DNA, viral DNA and bacterial DNA were isolated from a wide range of sample matrices such as blood, tissues, feces, ticks, milk, buccal swab, etc.

The eluates were used as real-time RT-PCR templates and produced highly specific PCR products with good yields.

7.2 Preparation time

The required preparation time always depends on the number of samples to be prepared.

Table 6 – Preparation time.

	DNA/RNA	Viral RNA
Total time	Approx. 70 minutes	Approx. 10 minutes
Manual time	Less than 10 minutes	Less than 10 minutes

8. TROUBLESHOOTING



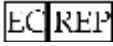

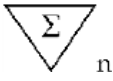







The following troubleshooting guide is included to help you with any problems that may arise during the isolation of the nucleic acid from different types of sampling material. Especially when working with complex sample matrices such as adipose tissue, whole blood or highly contaminated samples, sample preparation can be crucial. For protocols on sample materials not covered in this manual or for further questions about nucleic acid isolation, please contact us.

Low nucleic acid yield or purity	
Kit stored under non-optimal conditions.	Store kit at +18 to +25°C at all times upon arrival.
Buffers or other reagents were exposed to conditions that reduced their effectiveness	Store all buffers at +18 to +25°C. Close all reagent bottles tightly after each use to preserve pH and stability and to prevent contamination. Aliquot Poly A (PA) after reconstitution and store aliquots at ≤-18°C.
2-propanol not added to Binding Buffer (PV1)	Add 2-propanol to the buffer before using. After adding 2-propanol, mix the buffers well and store at +18 to 25°C. Always mark the buffer to indicate whether 2-propanol been added.
Ethanol not added to Inhibitor Removal Buffer (P2) and/or Wash Buffer (P3)	Add absolute ethanol to the buffers before using. After adding ethanol, mix the buffers well and store at +18 to 25°C. Always mark the buffer vials to indicate whether ethanol has been added or not.
Reagents and samples not completely mixed	Always mix the sample tube well after addition of each reagent.
Impurities not completely removed	Perform a second wash step with Wash Buffer (P3) in order to completely remove salts, proteins and other residual impurities from the bound nucleic acid.
Poor elution of nucleic acids with water	
Water has wrong pH	If you use your own water or buffer to elute nucleic acids from the Integra Spin Column, be sure it has the same pH as the Elution Buffer supplied in the kit.

EXBM001 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: sales@immunospark.com

9. SIMBOLI/SYMBOLS

	Manufacturer Fabbricante		For in vitro diagnostic use only Per solo uso diagnostico in vitro
	Authorized representative Rappresentante autorizzato		Consult instructions for use Leggere le istruzioni per uso
	Contains sufficient for <n> tests Contiene material per <n> test		Keep dry Mantenere all'asciutto
	Catalogue code Codice di catalogo		Temperature limitations Limiti di temperature
	Lot number Numero del lotto		Use by Utilizzare entro il
	Compliant to 98/79/EC directive Rispetta la direttiva 98/79/EC		Use only once Usare solo una volta

HEADQUARTER: Via lucrino 35 – 00199 – Rome – Italy
phone + 39 06 86324830 - Fax + 39 06 97252287 e-mail: sales@immunospark.com

R&D and MANUFACTURING: Via del mare 187,
00071 - Pomezia – Rome – Italia; e-mail: prod.pomezia@immunospark.com

www.immunospark.com