



# ***Integra RNA/DNA MAG extraction kit***

*Estrazione di acidi nucleici con Particelle magnetiche  
da multiple tipologie di campioni  
Nucleic acids extraction with magnetic particles  
from multiple kind of samples*

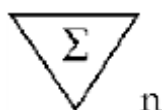
NUCLEIC ACIDS EXTRACTION SYSTEM  
SISTEMA DI ESTRAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

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

**REF**

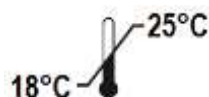
**EXMB003-50**

**EXMB003-200**



**50**

**200**



MEXMB003

**INDICE**

<b>1) INFORMAZIONI GENERALI/GENERAL INFORMATION</b>	<b>pag. 2</b>
1.1 Destinazione di uso/ <i>Intended use</i>	
1.2 Principio di funzionamento/ <i>Principle</i>	
<b>2) CONTENUTO DEL KIT/KIT CONTENTS</b>	<b>pag. 2</b>
<b>3) ISTRUZIONI PER LO STOCCAGGIO /STORAGE INSTRUCTIONS</b>	<b>pag. 3</b>
<b>4) MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI/UNPROVIDED MATERIALS</b>	<b>pag. 3</b>
<b>5) AVVERTENZE E PRECAUZIONI/WARNING AND PRECAUTIONS</b>	<b>pag. 3</b>
<b>6) PROCEDURA OPERATIVA/OPERATING PROCEDURE</b>	<b>pag. 4</b>
6.1 Preparazione dei reagenti/ <i>Reagents preparation</i>	
6.2 Procedura/ <i>Procedure</i>	
6.3 Gestione delle biglie magnetiche/ <i>Magnetic beads management</i>	
6.3.1. Distribuzione delle biglie magnetiche/ <i>Beads Distribution</i>	
6.3.2. Tempo di separazione magnetica/ <i>Magnetic separation time</i>	
6.3.3. Lavaggio dei biglie/ <i>Beads washing</i>	
6.4 Estrazione di DNA e RNA genomico/ <i>Genomic DNA/RNA extraction</i>	
6.4.1. Protocollo manuale/ <i>Manual protocol</i>	
6.4.2. Protocollo automatico su processore/ <i>Automatic protocol</i> KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor	
6.5. Estrazione di DNA da latte crudo o latte mastitico/ <i>Milk DNA Extraction</i>	
<b>7) INFORMAZIONI TECNICHE/TECHNICAL INFORMATION</b>	<b>pag. 9</b>
7.1 Controllo di qualità/ <i>Quality control</i>	
7.2 Tempo di preparazione/ <i>Preparation time</i>	
<b>8) TROUBLESHOOTING</b>	<b>pag. 9</b>
<b>9) SIMBOLI/SYMBOLS</b>	<b>pag. 11</b>

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

### 1. INFORMAZIONI GENERALI

#### 1.1 Destinazione di uso

**GENESPARK INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** è stato progettato per una rapida estrazione manuale o automatizzata degli acidi nucleici da una vasta gamma di campioni (ad es. campioni umani, campioni veterinari, insetti, campioni di cibo, ecc.). Il kit è stato progettato per essere utilizzato con processore di particelle magnetiche KingFisher™ Flex o altri sistemi di separazione magnetica. RNA/DNA purificato può essere utilizzato direttamente come template per RT-PCR, PCR o qualsiasi tipo di reazioni enzimatiche. Questo kit consente un'automazione facile su strumenti comuni di trattamento del liquido o separatori magnetici automatici. Il tempo di procedura effettivo dipende dalla configurazione dello strumento e dal sistema di separazione magnetica utilizzato.

#### 1.2 Principio di funzionamento

**GENESPARK INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** è progettato per l'analisi degli acidi nucleici mediante reazione a catena di polimerasi (PCR) o RT-PCR, in cui è necessario l'isolamento dell'analita da vari materiali del campione. A tal fine, il campione viene trattato mediante incubazione in un buffer di lisi proprietario.

Per legare gli acidi nucleici alle particelle magnetiche, le stesse particelle INTEGRA vengono aggiunte al lisato. In presenza di un sale, gli acidi nucleici si legano specificamente alla superficie delle particelle INTEGRA.

Dopo la separazione magnetica, le biglie paramagnetiche vengono lavate per rimuovere contaminanti e sali usando **Inhibitor Removal buffer** (P2) e il **Wash buffer** (P3). L'etanolo residuo proveniente dai passaggi precedenti di lavaggio viene rimosso mediante airdrying. Infine, l'RNA/DNA puro viene eluito con **Elution buffer** (P4) a basso tenore di sale. RNA/DNA purificato può essere utilizzato direttamente per applicazioni come descritto qui di seguito:

### 2. CONTENUTO DEL KIT

**INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** (REF EXMB003-50) può eseguire 50 estrazioni.

**INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** (REF EXMB003-200) può eseguire 200 estrazioni.

Tavola 1 – Contenuto del kit

CODICE	EXMB003-50	EXMB003-200
PV1 Binding buffer	1 x 30 ml + 26 ml 2-propanolo	2 x 30 ml + 26 ml 2-propanolo
PA Poly A	2 mg	4 mg
P2 Inhibitor Removal buffer	1 x 33 ml + 20 ml etanolo assoluto	2 x 33 ml + 20 ml abs etanolo assoluto
P3 Wash buffer	2 x 10 ml + 40 ml etanolo assoluto	2 x 20 ml + 80 ml etanolo assoluto
P4 Elution buffer	1 x 10,5 ml	1 x 21 ml
MB Magnetic beads	2 x 1.0 ml	4 x 1.0 ml

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.

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

### 3. ISTRUZIONI PER LO STOCCAGGIO

Tutti i componenti di **GENESPARK INTEGRA RNA/DNA MAG 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

- L'uso di **INTEGRA** con *KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor* e con *GENESPARK MD-EX Magnetic particles Processor (REF EQMD005)* è raccomandato ma il kit può essere usato anche con altri processori.
- Microtubi per centrifugazione Nuclease-free 1.5 o 2.0 ml.
- Piastra di separazione magnetica, ad esempio Square-well Block (96-well block with 2.1 ml square-wells)
- Piastra di eluizione per raccogliere gli acidi nucleici purificati, ad esempio Elution Plate V-bottom (96-well microtiterplate con pozzetti 0.3 ml u-bottom)
- Pipette con puntali per biologia molecolare o Tip Comps (e.g. KingFisher 96 tip comb per separazione magnetica).
- microcentrifuga da banco da 13,000 x RPM
- Etanolo assoluto
- Termoblocco o fornello da laboratorio (solo per estrazione di DNA)

Note: consumables for specific automatic processors are not included in the kit are dependent of the mode of sample preparation.

**Per le applicazioni manuali si suggerisce l'adozione del TABLET PRISMA TUTOR per la standardizzazione delle metodiche di Biologia molecolare in versione manuale.**

### 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 clinici devono sempre essere considerati come materiale potenzialmente infettivo e tutte le apparecchiature utilizzate devono essere trattate come potenzialmente contaminate.
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 standard per minimizzare il contatto durante la movimentazione. Non utilizzare candeggianti per il trattamento dei rifiuti!
5. Non lasciare che questi tamponi tocchi la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente l'area interessata con grandi quantità di acqua; altrimenti il reagente può causare ustioni. Se si versa il reagente, diluire la fuoriuscita con acqua prima di pulirla.
6. Non conservare o utilizzare i tamponi nei pressi di cibo umano o animale.

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

7. Indossare sempre i guanti e seguire le precauzioni di sicurezza standard quando si manipolano questi tamponi
8. Esercitare le normali precauzioni necessarie per la manipolazione di tutti i reagenti di laboratorio.
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. Evitare il contatto del buffer di rilascio e di rimozione dell'inibitore con la pelle, gli occhi o le membrane mucose. In caso di contatto, lavare immediatamente con grande quantità d'acqua. Eventuali ustioni possono verificarsi se non trattate. Se il reagente viene fuoriuscito, diluire con acqua prima di asciugare asciutto.
12. Non utilizzare alcuna etanolo modificato.
13. Utilizzare solo pipette calibrate
14. Tutti i materiali originari e tutti i rifiuti risultanti dovrebbero essere considerati potenzialmente infettivi. Pulire e disinfettare perfettamente tutte le superfici di lavoro con disinfettanti raccomandati dalle autorità locali.
15. Non mangiare, bere o fumare nell'area di lavoro del laboratorio.
16. Non pipettare per bocca.
17. Indossare guanti monouso protettivi, cappotti di laboratorio e protezione degli occhi quando si manipolano i campioni e reagenti del kit.
18. Evitare la contaminazione microbica e nucleasi dei reagenti quando si rimuove le aliquote dalle bottiglie di reagenti.
19. Si raccomanda l'uso di pipette sterilizzabili sterili.
20. Lavare le mani accuratamente dopo aver prelevato campioni e reagenti di prova.
21. Smaltire i reagenti non utilizzati e i rifiuti dovrebbero essere eseguiti in conformità con i regolamenti nazionali, federali e locali.
22. 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:

**Tavola 2 – Preparazione reagenti**

CODICE	Ricostituzione/Preparazione		Conservazione e stabilità	Scopo
	EXMB003-50	EXMB003-200		
<b>Poly A (PA)</b>	Dissolvere in 0,5 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.
<b>Binding Buffer (PV1)</b>	Aggiungere 26 ml 2-propanol Binding Buffer e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia.	Aggiungere 26 ml 2-propanol Binding Buffer e mescolare bene. Etichettare e datare la bottiglia.	Conservare a $+18^{\circ}\text{C}$ - $25^{\circ}\text{C}$ . stabile fino alla scadenza.	Lisi delle cellule

**EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT**

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

<b>Inhibitor Removal Buffer (P2)</b>	Aggiungere 20 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°C - 25°C. stabile fino alla scadenza.	Rimozione degli inibitori di PCR dagli acidi nucleici.
<b>Wash Buffer (P3)</b>	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°C - 25°C. stabile fino alla scadenza.	Rimozione Sali, proteine e altre impurezze dagli acidi nucleici.

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
<b>Feci</b>	Pea-size	500 ul	Preparare una sospensione in 1.5 ml di dH2O sterile. Vortexare e filtrare i sedimenti. Usare 200 ul di surnatante.
<b>Tampone</b>		500 ul	
<b>Campioni liquidi*</b>	200 ul	500 ul	
<b>Tessuto</b>	≤ 30 mg	500 ul	Omogeneizzazione del tessuto in Binding Buffer.
<b>Tessuto</b>	≤ 2x10 <sup>6</sup> cells	500ul	Raccogliere fino a 2 x 10 <sup>2</sup> cells. Risospendere il pellet in Binding Buffer.
<b>Latte</b>	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.

## 6.3. Gestione delle biglie magnetiche

### 6.3.1. Distribuzione delle biglie magnetiche

Una distribuzione omogenea delle biglie magnetiche nei singoli pozzetti della piastra di separazione è essenziale per un'elevata coerenza. Pertanto, prima di distribuire le biglie, assicurarsi che le biglie siano completamente omogeneizzate. Agitare bene la bottiglia o metterla in un vortex. Le biglie magnetiche di premiscelatura con il buffer di legame permettono una più facile distribuzione omogenea delle biglie nei singoli pozzetti della piastra di separazione. Durante l'automazione, è consigliabile eseguire una fase di

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

premiscela prima di aspirare le biglie/miscela di tampone di raccolta dal serbatoio per mantenerle risospese.

### 6.3.2. Tempo di separazione magnetica

L'attrazione delle biglie magnetiche ai perni magnetici dipende dalla forza magnetica dei perni magnetici, dalla piastra di separazione selezionata, dalla distanza della piastra di separazione dai perni magnetici e dal volume da elaborare. I singoli tempi per l'attrazione completa delle biglie ai perni magnetici devono essere controllati e regolati su ciascun sistema. Si raccomanda di utilizzare le piastre o i tubi di separazione specificati dal fornitore del separatore magnetico.

### 6.3.3. Lavaggio dei biglie

Il lavaggio delle biglie può essere ottenuto agitando o mescolando. In contrasto con la miscelazione pipettata verso l'alto e verso il basso, la miscelazione mediante agitatore o miscelazione magnetica consente la miscelazione simultanea di tutti i campioni. Ciò riduce il tempo e il numero di puntali necessari per la preparazione. La resospensione mediante pipettatura è comunque più efficace della miscelazione da un agitatore o da un mix magnetico.

### 6.4. 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.**

<b>Volume necessario per campione</b>	<b>Soluzione di lavoro della mastermix</b>
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.**

#### 6.4.1. Protocollo manuale

This protocol is for manual use and serves as a guideline for adapting the kit to robotic instruments.

##### **Step 1**

- Aggiungere una soluzione di lavoro di 500 µl, preparata di fresco in un tubo di microcentrifuga da 2,0 ml senza nucleasi.
- Aggiungere il campione da 200 µl al tubo di microcentrifuga.
- Mescolare immediatamente.
- Eseguire la incubazione per 60 minuti a 56-60°C.

## **EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT**

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

- Dopo l'incubazione di lisi, centrifugare per 5 sec a max. g per raccogliere qualsiasi campione dal tubo di lisi e trasferire ogni lisato nei pozzetti di un Square-well Block.

### **Step 2**

- Aggiungere 20 µl di biglie magnetiche **INTEGRA** (MB) al lisato.
- Mescolare immediatamente.
- Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente con agitazione (mix opzionale pipettando su e giù).
- Separare le biglie magnetiche dal lato dei pozzetti, posizionando il Square-well Block su un separatore magnetico. Attendere almeno 30 secondi fino a quando tutti le biglie sono stati attratti dai magneti. Rimuovere e scartare il surnatante pipettando. Non toccare le biglie attratte aspirando il surnatante.

### **Step 3**

- Rimuovere il Square-well Block dal separatore magnetico.
- Aggiungere 500 µl di buffer di rimozione dell'inibitore (P2) e risospendere le biglie agitando (miscelazione facoltativa pipettando verso l'alto e verso il basso) finché le biglie non vengono completamente risospese (almeno 30 secondi).
- Separare le biglie magnetiche dal lato dei pozzetti inserendo il Square-well Block del separatore magnetico. Attendere almeno 30 secondi fino a quando tutti le biglie sono state attratte dai magneti. Rimuovere e scartare il supernatante pipettando. Non disturbare le biglie attratte aspirando il surnatante.

### **Step 4**

- Rimuovere il Square-well Block dal separatore magnetico.
- Aggiungere un Wash buffer da 450 µl (P3) e risospendere le biglie agitando (miscelazione facoltativa pipettando verso l'alto e la città) finché le biglie non vengono completamente riposizionate (almeno 30 secondi)
- Separare le biglie magnetiche dal lato dei pozzetti inserendo il Square-well Block del separatore magnetico. Attendere almeno 30 secondi fino a quando tutti le biglie siano state attratte dai magneti. Rimuovere e scartare il surnatante pipettando. Non disturbare le biglie attratte aspirando il surnatante.

*\*Opzionale: lo step 4 può essere ripetuto per aumentare il grado di purezza.*

### **Step 5**

- Seccare la soluzione di biglie magnetiche per 5-10 minuti a temperatura ambiente.

### **Step 6**

- Rimuovere il Square-well Block dal separatore magnetico.
- Aggiungere 70-100 µl (opzionale: preriscaldato [56-60 ° C]) Elution buffer (P4). Incubare per 10 minuti a temperatura ambiente con agitazione.
- Separare le biglie magnetiche dal lato dei pozzetti inserendo il Square-well Block del separatore magnetico. Attendere almeno 30 secondi fino a quando tutti le biglie siano state attratte dai magneti.
- Il surnatante contiene acido nucleico purificato.
- Trasferire il surnatante su piastre di eluizione.

\* Per tipologie complesse di campioni, come i campioni di sangue intero o di feci, un ulteriore passo di lavaggio con il Wash buffer (P3) può aumentare la purezza dell'acido nucleico.



## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

### 6.4.2. Protocollo automatico su processore KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor

#### **Step 1 - Preparazione del campione Parte I e Lisi**

- Aggiungere 500 µl di soluzione di lavoro appena preparata a ciascun pozzetto di una piastra a 96 pozzetti.
- Aggiungere 200 µl di campione.
- Mescolare immediatamente.
- Eseguire la incubazione per 60 minuti a 56-60°C.

#### **Step 2 - Preparazione delle piastre di lavaggio**

- Aggiungere 500 µl di **Inhibitor removal buffer (P2)** ad ogni pozzetto di una piastra da 96 deep-well.
- **Aggiungere 450 µl** di Wash buffer (P3) a ciascun pozzetto della piastra deep-well.
- **Aggiungere 450 µl** di Wash buffer (P3) a ciascun pozzetto di una seconda piastra deep-well.

#### **Step 3 – Preparazione della piastra di eluizione**

- Aggiungere 70-100 µl di Elution buffer (P4) ad ogni pozzetto di una piastra da 96 deep-well.

#### **Step 4 - Preparazione del campione Parte II/binding**

- Aggiungere 20 µl di particelle magnetiche **INTEGRA** al lisato.

#### **Step 6 – Esecuzione del protocollo di purificazione sullo strumento**

- Inserire le piastre come indicato dallo strumento *KingFisher™*.
- il metodo inizia con uno step combinato di lisi e binding dopo avere impostato l'ultima piastra sullo strumento.

#### **Step 7 – Rimozione di RNA/DNA eluito**

- Lo strumento si arresta dopo l'ultimo step di eluizione. Seguendo le istruzioni dello strumento scaricare le piastre usate.
  - Il RNA/DNA purificato può essere ora utilizzato per procolli di detection.
- Per le impostazioni di KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors utilizzare la guida che può essere fornita separatamente da IMMUNOSPARK.

### 6.5. Estrazione di DNA da latte crudo o latte mastitico

Materiali addizionali necessari:

- Sample Preparation Buffer SPM

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
<b>500 ul Binding Buffer (PV1)</b>	500 ul x (N+1)
<b>4 ul Poly A (PA)</b>	4 ul x (N+1)
<b>100 ul Samples Preparation Buffer</b>	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.

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

- 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 istruzioni per 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 biglie INTEGRA, 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 10<sup>5</sup> 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
<b>Tempo totale</b>	Approx. 100 minuti	Approx. 40 minuti
<b>Tempo manualità</b>	Meno di 10 minuti	Meno di 10 minuti

## 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.

**EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT**

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

<b>Bassa resa o purezza di acidi nucleici</b>	
Volume di Elution Buffer insufficiente.	Il pellet di biglie deve essere coperto completamente con Elution Buffer.
Prestazioni insufficienti dell'Elution buffer durante Lo step di eluizione	Rimuovere i residui di buffer durante i passaggi di separazione completamente. I residui riducono l'efficienza dei seguenti passaggi di lavaggio ed eluizione.
Particelle essiccate	Non lasciare asciugare le biglie, in quanto ciò potrebbe comportare una diminuzione di efficienza di eluizione.
Aspirazione accidentale di biglie magnetiche separate	Non disturbare le biglie attirate durante l'aspirazione del surnatante, soprattutto quando la biglia magnetica del pellet non è visibile nel lisato.
Aspirazione e perdita di biglie magnetiche	Tempo per la separazione magnetica troppo breve o velocità di aspirazione troppo elevata.
Lavaggio insufficiente	Utilizzare solo le combinazioni appropriate del separatore e delle piastre. Assicurarsi che le biglie siano completamente risospese durante la procedura di lavaggio. Se la agitazione non lo è sufficiente a risospingere le biglie completamente, mescolare ripetutamente pipettando.
Carry over di Etanolo dal Wash buffer	Assicurarsi di rimuovere tutta la Wash buffer di etanolo dal lavaggio finale, perchè interferisce.
Evaporazione di Etanolo dal Wash buffer	Chiudere bene i flaconi del tampone, evitando l'evaporazione dell'etanolo. Non riutilizzare i tamponi.
Tempo di separazione magnetica troppo breve	Aumentare il tempo di separazione per consentire alle biglie di essere completamente attratti dai perni magnetici prima di aspirare qualsiasi liquido dal pozzetto.
Velocità eccessiva di aspirazione (Eluizione)	L'elevata velocità di aspirazione durante il passo di eluizione può causare aspirazione delle biglie. Ridurre la velocità di aspirazione per il passo di eluizione.
Kit conservato impropriamente (T)	Conservare il kit a +18 a + 25°C in qualsiasi momento all'arrivo.
Reagenti esposti ad agenti esterni	Conservare tutti i buffer a +18 a + 25°C. Chiudere bene tutte le bottiglie dei reagenti dopo ogni uso per preservare il pH e la stabilità e per prevenire la contaminazione. Aliquotare Poly A (PA) dopo la ricostituzione e conservare aliquote a ≤ -18°C.
2-Propanolo non aggiunto a PV1	Aggiungere 2-propanolo al buffer prima di utilizzarlo. Mescolare bene il buffer e conservare a +18 a 25°C. Contrassegnare sempre il flacone di tampone per indicare se è stato aggiunto o meno il 2-propanolo.
Etanolo non aggiunto a P2 e/o P3	Aggiungere etanolo assoluto ai buffers prima dell'uso. Dopo aver aggiunto l'etanolo, mescolare bene i buffers e conservare a +18 a 25 ° C. Contrassegnare sempre i flaconi tampone per indicare se è stato aggiunto o meno l'etanolo.
Reagenti e campioni non completamente mescolati	Mescolare sempre bene il tubo di campionamento dopo l'aggiunta di ciascun reagente.
Impurezze non completamente rimosse	Eseguire un secondo passo di lavaggio con il Wash buffer (P3) per rimuovere completamente sali, proteine e altre impurità residue dall'acido nucleico legato.

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

### 1. GENERAL INFORMATION

#### 1.1 Intended use

**GENESPARK INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** has been designed for rapid manual or automated extraction of nucleic acids from a wide range of samples (eg human samples, veterinary samples, insects, food samples, etc.). The kit is designed to be used with KingFisher™ Flex magnetic particle processor or other magnetic separation systems. Purified RNA / DNA can be used directly as a template for RT-PCR, PCR or any type of enzymatic reactions. This kit allows easy automation on common liquid treatment instruments or automatic magnetic separators. The actual procedure time depends on the configuration of the instrument and the magnetic separation system used.

#### 1.2 Principle

**GENESPARK INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** is designed for nucleic acid analysis by polymerase chain reaction (PCR) or RT-PCR, where analyte isolation from various sample materials is required. To this end, the sample is treated by incubation in a proprietary lysis buffer.

To bind nucleic acids to magnetic particles, the same INTEGRA particles are added to the lysate. In the presence of a salt, the nucleic acids bind specifically to the surface of the particles INTEGRA.

After magnetic separation, paramagnetic beads are washed to remove contaminants and salts using **Inhibitor Removal buffer** (P2) and the **Wash buffer** (P3). The residual ethanol from the previous washing steps is removed by airdrying. Finally, pure RNA / DNA is eluted with **Elution buffer** (P4) low in salt. Purified RNA / DNA can be used directly for applications as described below.

### 2. KIT CONTENTS

**INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** (REF EXMB003-50) can execute 50 extractions.

**INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** (REF EXMB003-200) can execute 200 extractions.

Tavola 1 – Kit contents

REF	EXMB003-50	EXMB003-200
<b>PV1 Binding buffer</b>	1 x 30 ml + 26 ml 2-propanol	2 x 30 ml + 26 ml 2-propanol
<b>PA Poly A</b>	2 mg	4 mg
<b>P2 Inhibitor Removal buffer</b>	1 x 33 ml + 20 ml absolute ethanol	2 x 33 ml + 20 ml absolute ethanol
<b>P3 Wash buffer</b>	2 x 10 ml + 40 ml absolute ethanol	2 x 20 ml + 80 ml absolute ethanol
<b>P4 Elution buffer</b>	1 x 10,5 ml	1 x 21 ml
<b>MB Magnetic beads</b>	2 x 1.0 ml	4 x 1.0 ml

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.

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

### 3. STORAGE INSTRUCTIONS

All the components of **GENESPARK INTEGRA RNA/DNA MAG EXTRACTION KIT** must be stored at +18 to + 25 ° C. If they are stored correctly, all kit components are stable until the expiration date printed on the label. Please note that improper storage at +2 to + 8 ° C (refrigerator) or -15 to -25 ° C (freezer) will adversely affect the purification of the nucleic acid when precipitation is formed in the solutions. Therefore 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  $\leq -18$  ° C.

### 4. UNPROVIDED MATERIALS

- Use of **INTEGRA** con *KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor* e con *GENESPARK MD-EX Magnetic particles Processor (REF EQMD005)* it is recommended but the kit can also be used with other processors.
- Microtubes for centrifugation Nuclease-free 1.5 o 2.0 ml.
- Magnetic separation plate, for example Square-well Block (96-well block with 2.1 ml square-wells)
- Elution plate for collecting purified nucleic acids, for example Elution Plate V-bottom (96-well microtiterplate with 0.3 ml u-bottom wells)
- Pipettes with tips for molecular biology or Tip Comps (e.g. KingFisher 96 tip comb for magnetic separation).
- microcentrifuge bench-top 13,000 x RPM .
- Absolute ethanol
- Thermoblock or laboratory oven (only for DNA extraction)

Note: consumables for specific automatic processors are not included in the kit are dependent of the mode of sample preparation.

**For manual applications we suggest the adoption of the TABLET PRISMA TUTOR for the standardization of molecular biology methods in manual version.**

### 5. WARNING AND PRECAUTIONS

1. This Kit should only be used by qualified personnel.
2. Good Laboratory Practice (GLP) must be applied.
3. Clinical samples should always be considered as potentially infectious material and all equipment used must be treated as potentially contaminated.
4. The integrated release buffer and inhibitor removal buffer contain hydrochloride guanidine which is an irritant. Always wear gloves and follow standard safety precautions to minimize contact during handling. Do not use bleaches for waste treatment!
5. Do not let these swabs touch the skin, eyes or mucous membranes. In case of contact, immediately flush the affected area with large quantities of water; otherwise the reagent can cause burns. If the reagent is poured, dilute the spill with water before cleaning it.
6. Do not store or use tampons near human or animal food.
7. Always wear gloves and follow standard safety precautions when handling these swabs
8. Exercise the normal precautions necessary for the handling of all laboratory reagents.

**EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT**

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

9. 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.
10. Do not use a kit after the expiration date.
11. Avoid contact of the release buffer and inhibitor removal with skin, eyes or mucous membranes. In case of contact, wash immediately with large quantities of water. Possible burns can occur if not treated. If the reagent is leaked, dilute with water before drying it dry.
12. Do not use any modified ethanol.
13. Use only calibrated pipettes
14. All originating materials and all resulting waste should be considered potentially infectious. Clean and disinfect all work surfaces perfectly with disinfectants recommended by local authorities.
15. Do not eat, drink or smoke in the laboratory work area.
16. Do not pipette by mouth.
17. Wear protective disposable gloves, laboratory coats and eye protection when handling specimens and kit reagents.
18. Avoid microbial and nuclease contamination of reagents when removing aliquots from reagent bottles.
19. Sterile sterile pipettes are recommended.
20. Wash hands thoroughly after taking samples and test reagents.
21. Dispose of unused reagents and waste should be performed in accordance with national, federal and local regulations.
22. Material Safety Data Sheets (MSDS) are available on request from Immunospark.

**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
	EXMB003-50	EXMB003-200		
<b>Poly A (PA)</b>	Dissolve in 0.5 ml of Elution Buffer and prepare aliquots of 50 ul.	Dissolve in 1.00 ml of Elution Buffer and prepare aliquots da 50.	Store aliquots at $\leq -18^{\circ}$ C, stable for 12 months.	Additive of the binding buffer.
<b>Binding Buffer (PV1)</b>	Add 26 ml 2-propanol Binding Buffer and mix well. Label and date the bottle.	Add 26 ml 2-propanol Binding Buffer and mix well. Label and date the bottle.	Store at $+ 18^{\circ}$ C - $25^{\circ}$ C. stable until expiration.	Lysis of cells
<b>Inhibitor Removal Buffer (P2)</b>	Add 20 ml of absolute ethanol to the Residue Removal Buffer and mix well. Label and date the bottle	Add 20 ml of absolute ethanol to the Residue Removal Buffer and mix well. Label and date the bottle	Store at $+ 18^{\circ}$ C - $25^{\circ}$ C. stable until expiration.	Removal of PCR inhibitors from nucleic acids.

**EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT**

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

<b>Wash Buffer (P3)</b>	Add 40 ml of absolute ethanol to the Wash Buffer and mix well. Label and date the bottle	Add 80 ml of absolute ethanol to the Wash Buffer and mix well. Label and date the bottle	Store at + 18 ° C - 25 ° C. stable until expiration.	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 sample sources**

Sample type	Volume/Quantity	Volume Binding Buffer	Pre-treatment of the sample
<b>Stool</b>	Pea-size	500 ul	Prepare a suspension in 1.5 ml of sterile dH2O. Vortex and filter the sediments. Use 200 µl of supernatant.
<b>Swab</b>		500 ul	
<b>Liquid samples*</b>	200 ul	500 ul	
<b>Tissue</b>	≤ 30 mg	500 ul	Homogenization of the tissue in Binding Buffer.
<b>Tissue</b>	≤ 2x10 <sup>6</sup> cells	500ul	Collect up to 2 x 10 <sup>2</sup> cells. Resuspend the pellet in Binding Buffer.
<b>Milk</b>	100 ul	600**ul	** Dilution of 100 ul of 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.

## 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.

## 6.3. Magnetic beads management

### 6.3.1. Magnetic beads distribution

A homogeneous distribution of the magnetic beads in the individual wells of the separation plate is essential for high consistency. Therefore, before distributing the marbles, make sure the marbles are completely homogenized. Shake the bottle well or put it in a vortex. The premixing magnetic beads with the binding buffer allow an easier homogeneous distribution of the marbles in the individual wells of the separation plate. During automation, it is advisable to perform a premix phase before sucking the marbles / collection buffer mixture from the tank to keep them resuspended.

### 6.3.2. Magnetic separation time

The attraction of the magnetic beads to the magnetic pins depends on the magnetic force of the magnetic pins, the selected separation plate, the distance of the separation plate from the magnetic pins and the volume to be processed. The individual times for the complete attraction of the balls to the magnetic pins must be checked and adjusted on each system. It

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

is recommended to use the separation plates or tubes specified by the magnetic separator supplier.

### 6.3.3. Beads washing

The washing of the marbles can be obtained by shaking or mixing. In contrast to the pipetted mixing up and down, mixing by stirrer or magnetic mixing allows simultaneous mixing of all samples. This reduces the time and the number of tips needed for preparation. Resuspension by pipetting is however more effective than mixing from an agitator or a magnetic mix.

### 6.4. 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 – Preparation of working solutions of DNA and RNA.**

Sample needed volume	Working solution of the 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 in DNA.**

#### 6.4.1. Manual protocol

This protocol is for use and serves as a guideline for adapting the kit to robotic instruments.

##### Step 1

- Add a working solution of 500 µl, freshly prepared in a 2.0 ml microcentrifuge tube without nuclease.
- Add the 200 µl sample to the microcentrifuge tube.
- Mix immediately.
- Incubate for 60 minutes at 56-60 ° C.
- After lysis incubation, centrifuge for 5 seconds at max. g to collect any sample from the lysis tube and transfer each lysate into the wells of a Square-well Block.

##### Step 2

- Add 20 µl of INTEGRA (MB) magnetic beads to the lysate.
- Stir immediately.
- Incubate for 10 minutes at room temperature with stirring (optional mix by pipetting up and down).
- Separate the magnetic beads from the side of the wells, positioning the Square-well Block on a magnetic separator. Wait at least 30 seconds until all the marbles have been attracted



## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

to the magnets. Remove and discard the supernatant by pipetting. Do not touch the attracted marbles by aspirating the supernatant.

### **Step 3**

- Remove the Square-well Block from the magnetic separator.
- Add 500 µl of inhibitor removal buffer (P2) and resuspend the beads by shaking (optional mixing by pipetting up and down) until the beads are completely resuspended (at least 30 seconds).
- Separate the magnetic beads from the side of the wells by inserting the Square-well Block of the magnetic separator. Wait at least 30 seconds until all the marbles have been attracted to the magnets. Remove and discard the supernatant by pipetting. Do not disturb the attracted marbles by aspirating the supernatant.

### **Step 4**

- Remove the Square-well Block from the magnetic separator.
  - Add a 450 µl Wash buffer (P3) and resuspend the marbles by shaking (optional mixing by pipetting upwards and the city) until the beads are completely repositioned (at least 30 seconds)
  - Separate the magnetic beads from the side of the wells by inserting the Square-well Block of the magnetic separator. Wait at least 30 seconds until all the marbles have been attracted to the magnets. Remove and discard the supernatant by pipetting. Do not disturb the attracted marbles by aspirating the supernatant.
- \* Optional: step 4 can be repeated to increase the degree of purity.

### **Step 5**

- Dry the magnetic ball solution for 5-10 minutes at room temperature.

### **Step 6**

- Remove the Square-well Block from the magnetic separator.
  - Add 70-100 µl (optional: preheated [56-60 ° C]) Elution buffer (P4). Incubate for 10 minutes at room temperature with stirring.
  - Separate the magnetic beads from the side of the wells by inserting the Square-well Block of the magnetic separator. Wait at least 30 seconds until all the marbles have been attracted to the magnets.
  - The supernatant contains purified nucleic acid.
  - Transfer the supernatant to elution plates.
- \* For complex sample types, such as whole blood or stool samples, a further wash step with the Wash buffer (P3) can increase the purity of the nucleic acid.

## **6.4.2. Automatic protocol on KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processor**

### **Step 1 – Sample preparation Part I and Lysis**

- **Add 500 µl** of freshly prepared work solution to each well of a 96-well plate.
- **Add 200 µL** of sample.
- **Mix** immediately.
- **Incubate** for 60 minutes at 56-60°C.

### **Step 2 – Washing plates preparation**

- **Add 500 µl** of Inhibitor removal buffer (P2) to each well of a 96 plate deep-well.

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

- Add 450 µl of Wash buffer (P3) to each well of the deep-well plate.
- Add 450 µl of Wash buffer (P3) to each well of a second deep-well plate.

### **Step 3 – Elution plate preparation**

- Add 70-100 µl of Elution buffer (P4) of each well of a plate with 96 deep-well.

### **Step 4 – sample preparation Part II/binding**

- Add 20 µl of magnetic particles *INTEGRA* to the lysate.

### **Step 6 – Purification protocol execution on the equipment**

- Insert the plates as indicated by the KingFisher™ tool.
- the method starts with a combined lysis and binding step after setting the last plate on the instrument.

### **Step 7 – removal of eluted RNA/DNA**

- The instrument stops after the last elution step. Following the instructions of the instrument, download the used plates.
- Purified RNA / DNA can now be used for detection.

For the KingFisher™ Flex Magnetic Particle Processors settings, use the guide that can be supplied separately from IMMUNOSPARK.

## **6.5. DNA extraction from raw milk**

Needed additional materials:

- 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 – Working solution preparation for extraction of DNA and RNA from 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 **following** see the instruction for the extraction of genomic DNA/RNA.

## **7. TECHNICAL INFORMATION**

### **7.1 Quality control**

According to the ISO procedures of Immunospark, each lot of *INTEGRA* is tested on the basis of pre-established specifications to guarantee a constant product quality.

## EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

The dilution series of MS2 RNA, Lambda-Phage DNA and human genomic DNA are applied to INTEGRA marbles, washed and eluted according to the kit protocol. 4 µl of the eluate is analyzed in real time (RT-) PCR. Recovery of at least  $2 \times 10^5$  RNA or DNA molecules for 200 µl of sample is guaranteed.

For the validation of the viral RNA of INTEGRA, genomic DNA, viral DNA and bacterial DNA have been 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
<b>Total time</b>	Aprox. 100 minutes	Aprox. 40 minutes
<b>Manual time</b>	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.



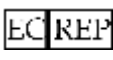

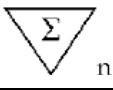







<b>Low quality of nucleic acids</b>	
Insufficient Elution Buffer volume.	The pellet of beads must be completely covered with Elution Buffer.
Insufficient Performance of the buffer during elution	Remove buffer residues during separation steps completely. Residues reduce efficiency of the following washing and elution steps.
Dried particles	Do not allow the marbles to dry out as this may result in decreased efficiency of elution.
Accidental suction of separate magnetic beads	Do not disturb the marbles attracted during aspiration of the supernatant, especially when the magnetic pellet is not visible in the lysate.
Aspiration and loss of magnetic beads	Time for magnetic separation too short or suction speed too high.
Insufficient washing	Use only the appropriate separator combinations and of the plates. Ensure that the beads are resuspended during the washing. If the agitation is not sufficient to resuspend completely, mix repeatedly.
Carry over of ethanol from Wash buffer	Be sure to remove all the ethanol Wash buffer from the final wash, because it interferes.
Evaporation of ethanol from Wash buffer	Close the bottles of the buffer well, avoiding the evaporation of the ethanol. Do not reuse the pads.
Magnetic separation time too short	Increase the separation time to allow the marbles to be completely attracted by the magnetic pins before drawing any liquid from well.

**EXMB003 INTEGRA RNA/DNA EXTRACTION KIT**

Info: [sales@immunospark.com](mailto:sales@immunospark.com)

Excessive suction speed (Elution)	The high suction speed during the elution step can cause the suction of the balls. Reduce the suction speed for the elution step.
Kit improperly stored (T)	Store the kit at +18 a + 25°C at the arrival.
Reagents exposed to external agents	Store all buffers at +18 to + 25 ° C. Close all reagent bottles well 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 PV1	Add 2-propanol to the buffer before using it. Mix the buffer well and store at +18 at 25 ° C. Always mark the buffer bottle to indicate whether or not 2-propanol was added.
Ethanol not added to P2 e/o P3	Add absolute ethanol to the buffers before use. After adding ethanol, mix the buffers well and store at +18 to 25 ° C. Always mark the buffer bottles to indicate whether or not ethanol has been added.
Reagents and samples not completely mixed	Always mix the sample tube well after adding each reagent.
Impurities not completely removed	Perform a second wash step with the Wash buffer (P3) to completely remove salts, proteins and other residual impurities from the bound nucleic acid.

**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](mailto:sales@immunospark.com)

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

[www.immunospark.com](http://www.immunospark.com)