

STOOL DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-328

Armazenamento: ambiente

Descrição:

O Stool DNA Kit fundamenta-se na tecnologia de purificação em membrana de sílica para a extração de DNA genômico (gDNA) a partir de amostras fecais. A coluna de centrifugação é composta por uma matriz de sílica otimizada, capaz de promover a adsorção seletiva do DNA sob condições específicas de força iônica (salinidade) e pH. Etapas sequenciais de centrifugação garantem a eluição e a remoção completa de interferentes, tais como proteínas, compostos orgânicos e demais contaminantes coextraídos. O gDNA isolado por este método apresenta elevados índices de rendimento, pureza e integridade molecular (gDNA íntegro/fita dupla total). Consequentemente, o gDNA purificado demonstra-se apto para aplicações moleculares subsequentes (downstream), incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Considerações Importantes

Solicita-se a leitura destas recomendações antes da inicialização do protocolo.

1. Preservação das Amostras: Ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento das amostras armazenadas devem ser estritamente evitados, visto que a criopreservação inadequada induz à fragmentação mecânica e à degradação quantitativa do DNA.
2. Solubilização de Reagentes: Caso observe-se a formação de precipitados nos Tampões SA ou SC, submeta a solução a banho-maria ou incubação a 37°C até a completa redissolução dos solutos.
3. Homogeneização do Espécime: Recomenda-se a homogeneização vigorosa e completa da amostra. A dispersão ineficiente do material biológico compromete a cinética de lise celular, impactando negativamente o rendimento final e as razões de pureza espectrofotométrica.
4. Ajuste Volumétrico por Higroscopicidade: Em matrizes amostrais com elevada capacidade de absorção de água, os volumes dos Tampões SA e SC podem ser incrementados proporcionalmente. Alíquotas adicionais destes tampões estão disponíveis para aquisição independente.
5. Condições de Centrifugação: Todas as etapas de centrifugação devem ser executadas em microcentrifuga de bancada convencional, sob condições de temperatura ambiente controlada.

Componentes do kit

Componente	Volume
Tampão SA	30ml
Tampão SC	5ml
Tampão SH	10ml
Tampão GFA	10ml
Tampão GD	13ml
Tampão PW	15ml
Tampão TB	15ml
Proteinase K	1ml
RNAse A (10ml/ml)	600µl
Beads de 1mm	15g
RNAse-free Spin Columns CR2	50
Collection Tubes 2ml	50

Preparo Prévio de Reagentes :

Certifique-se de que os Tampões GD e PW foram devidamente suplementados com o volume especificado de etanol absoluto (96–100%), e que o Tampão GFA foi suplementado com o volume indicado de isopropanol, conforme as instruções constantes nos respectivos rótulos. Após a adição, homogeneize as soluções por agitação vigorosa.

Protocolo Experimental:

1. Aliquotar uma massa de 180–220 mg da amostra fecal em um tubo de microcentrífuga de 2 mL (não fornecido) e armazene o tubo imediatamente em banho de gelo.

Nota: Para amostras em fase líquida (consistência fluida), pipete uma alíquota de 200µL diretamente no tubo de microcentrífuga.

2. Adicione à amostra 500 µL do Tampão SA, 100 µL do Tampão SC, 15 µL de Proteinase K e 0,25 g de esferas de lise (*Beads*). Submeta a suspensão à agitação vigorosa contínua em vórtex por, no mínimo, 10 minutos, até a completa homogeneização da matriz fecal.

Nota: A utilização do homogeneizador de tecidos *TGrinder H24* otimiza o tempo de lise para 1 minuto, permitindo o processamento simultâneo de até 24 amostras (consulte o suporte técnico para especificações detalhadas).

3. Incube a suspensão a 70°C por 15 minutos, agitando em vórtex por 2 a 3 vezes durante o período de incubação.

Nota: Para espécimes de difícil lise celular (como bactérias Gram-positivas), a temperatura de incubação pode ser elevada para 95°C para otimizar a ruptura da parede celular.

4. Agite em vórtex por 15 segundos e, em seguida, centrifugue a 12.000rpm (13.400xg) por 3 minutos. Transfira o sobrenadante obtido para um novo tubo de microcentrífuga de 2 mL. Adicione 10 µL de RNase A, homogeneize completamente e incube em temperatura ambiente por 5 minutos para a degradação de RNA residual.
5. Adicione 200 µL do Tampão SH, homogeneize vigorosamente e incube em banho de gelo por 5 minutos.
6. Centrifugue a 12.000rpm (13.400xg) por 3 minutos para sedimentar os complexos insolúveis.
7. Transfira o sobrenadante resultante para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicione um volume equivalente do Tampão GFA (previamente suplementado com isopropanol, conforme instruções de preparo).
8. Transfira a mistura para uma Coluna de Centrifugação CR2 livre de RNase (acoplada a um tubo de coleta de 2 mL) e centrifugue a 12.000rpm (13.400xg) por 30 segundos. Descarte o eluato (*flow-through*) e reintroduza a Coluna CR2 no mesmo tubo de coleta.
9. Adicione 500 µL do Tampão GD à Coluna CR2 (previamente suplementado com etanol 96–100%) e centrifugue a 12.000rpm (13.400xg) por 30 segundos. Descarte o eluato e recoloque a coluna no tubo de coleta.
10. Adicione 700 µL do Tampão PW à Coluna CR2 (previamente suplementado com etanol 96–100%) e centrifugue a 12.000rpm (13.400xg) por 30 segundos. Descarte o eluato e recoloque a coluna no tubo de coleta.
11. Repita integralmente a etapa de lavagem com o Tampão PW (Etapa 9).
12. Centrifugue a 12.000rpm (13.400xg) por 2 minutos para eliminar traços de líquidos. Descarte o eluato e incube a Coluna CR2 em temperatura ambiente por alguns minutos para a evaporação completa e secagem da membrana de sílica.

Nota: Resíduos de etanol provenientes do Tampão PW podem atuar como inibidores enzimáticos em aplicações moleculares subsequentes (*downstream*).

13. Transfira a Coluna CR2 para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL estéril e livre de nucleases. Pipete 50 µL do Tampão TB diretamente no centro da membrana de sílica. Incube em temperatura ambiente por 2 a 5 minutos e centrifugue a 12.000rpm (13.400xg) por 2 minutos para eluir o DNA purificado. Recolha o volume eluído.

Nota: Para maximizar o rendimento e a eficiência de recuperação do gDNA, o eluato obtido na Etapa 12 pode ser reaplicado no centro da membrana da Coluna CR2, seguido por uma nova centrifugação 12.000rpm (13.400xg) por 2 minutos.

Otimização da Eluição e Armazenamento

O potencial hidrogênio (pH) da solução de eluição influencia diretamente a eficiência de dessorção do DNA da matriz de sílica. Recomenda-se a utilização do Tampão TB ou, alternativamente, de água destilada com pH ajustado na faixa de 7,0 a 8,5 para a eluição do DNA genômico (gDNA).

Para a preservação a longo prazo, preconiza-se a eluição em Tampão TB e o subsequente armazenamento sob congelamento a -20°C. O armazenamento prolongado do gDNA em água não tamponada deve ser evitado, visto que a macromolécula fica suscetível à degradação por hidrólise ácida.

Contatos:

- **Website:** www.genexplore.com.br
- **E-mail:** suporte@genexplore.com.br
- **Importado por:** Genexplore, Comércio, Importação e Exportação Ltda

CNPJ: 62.359.822/0001-10 / I.E: 155.425.101.110

Av: Primeiro de Maio 379 – sala 04 – Ribeirão Preto – SP – 14030-390