

BACTERIA DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-302

Armazenamento: ambiente

Descrição:

O BACTERIA DNA KIT fundamenta-se na tecnologia de purificação por membrana de sílica, empregando um sistema tampão otimizado para a isolamento de DNA genômico (gDNA) a partir de diversas matrizes biológicas. As colunas de rotação (*spin*) são constituídas por uma matriz de sílica de última geração, projetada para promover a adsorção seletiva do DNA sob condições rigorosamente controladas de força iônica e pH. O procedimento de centrifugação fracionada garante a eliminação completa de contaminantes interferentes e inibidores enzimáticos, tais como proteínas residuais e cátions divalentes. O DNA purificado é subsequentemente eluído em tampão de baixa força iônica ou água de pureza analítica, estando apto para aplicações biotecnológicas subsequentes. O ácido nucleico obtido apresenta elevadas taxas de pureza e integridade, sendo altamente adequado para digestão por enzimas de restrição, amplificação por PCR, *Southern blotting* e construção de bibliotecas de cDNA.

Características

1. O isolamento e a purificação de DNA genômico íntegro a partir de bactérias Gram-negativas são obtidos em um intervalo inferior a uma hora.
2. O DNA genômico purificado apresenta qualidade analítica compatível com aplicação direta em ensaios moleculares subsequentes (*downstream*), tais como reação em cadeia da polimerase (PCR), clivagem por endonucleases de restrição, hibridização pelo método de *Southern blotting*, entre outras análises correlatas.

Conteúdo do kit:

Componente	Volume
Tampão de Lise I	15ml
Tampão de Lise II	15ml
Tampão de Remoção	13ml
Tampão de Lavagem	15ml
Tampão de Eluição	15ml
Proteinase K	1ml
Colunas Spin	50 unid.
Tubos de Coleta	50 unid.

Referência de Rendimento

Tipo de Bactéria	Bactéria Gram-negativa	Bactéria Gram-Positiva
Concentração Bacteriana	2×10^6 células/ml	$3,5 \times 10^8$ células/ml
Volume de Cultura	1ml	1ml
Rendimento do DNA	15-20µg	6-13µg
OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	1,7-1,9	1,7-1,9

Nota: O rendimento do DNA genômico obtido pode variar em função do táxon bacteriano, da fase de crescimento e do tempo de cultivo. Bactérias Gram-positivas requerem um pré-tratamento enzimático específico (ex.: incubação com lisozima) para a lise efetiva da parede celular peptidoglicana; após esta etapa, o protocolo de extração do DNA genômico prossegue em conformidade com o procedimento padronizado para bactérias Gram-negativas.

Protocolo Experimental

Preparo Prévio: Adicionar ao Tampão de Remoção, 17ml e ao Tampão de Lavagem, 60ml, de etanol absoluto antes do início do protocolo. Homogeneíze vigorosamente por agitação antes do uso.

1. Adicione de 1 a 5 mL da suspensão de cultura bacteriana em um microtubo de centrifugação. Centrifugue a 10.000 rpm ($\approx 11.500 \times g$) por 1 min e descarte o sobrenadante por aspiração ou decantação, removendo o máximo de meio residual possível.
2. Adicione 200 µL do Tampão de Lise I. Homogeneíze completamente a suspensão celular por agitação em vortex.
 - *Opcional (Degradação de RNA):* Para a obtenção de DNA genômico isento de contaminação por RNA, adicione 4 µL de RNase A (100 mg/mL, fornecida pelo usuário), homogeneíze em vortex por 15 s e incube por 5 min à temperatura ambiente (15 – 30°C).
3. Adicione 20 µL de Proteinase K e homogeneíze completamente por agitação em vortex.
4. Adicione 220 µL de Tampão de Lise II à amostra, vortexe por 15 s e incube a 70°C por 10 min até a obtenção de uma solução homogênea. Realize uma breve centrifugação do microtubo de 1,5 mL (*quick spin*) para recolher as gotículas retidas na tampa.
 - *Nota:* A adição do Tampão de Lise II pode induzir a formação de um precipitado esbranquiçado. O precipitado não interfere na eficiência do processo e será redissolvido durante o período de incubação térmica a 70°C. A persistência de precipitado após a incubação indica lise incompletude celular, o que compromete o rendimento e a pureza do DNA final.
5. Adicione 220 µL de etanol (96% – 100%) e homogeneíze vigorosamente em vortex por 15 s. A adição de etanol pode resultar na precipitação visível de ácidos nucleicos. Realize uma breve centrifugação (*quick spin*) para remover eventuais gotas da tampa do microtubo.

6. Transfira o volume total da mistura obtida na etapa 5 para a coluna de rotação Spin (acoplada ao tubo de coleta de 2 mL) e centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 30 s. Descarte o efluente do tubo de coleta e reencaixe a coluna no mesmo tubo.
7. Adicione 500 μL do Tampão de Remoção a coluna Spin e centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 30 s. Descarte o efluente e reposicione a coluna no tubo de coleta.
8. Adicione 600 μL do Tampão de Lavagem a coluna Spin e centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 30 s. Descarte o efluente e reposicione a coluna no tubo de coleta.
9. Repita a etapa de lavagem com o Tampão de Lavagem (Etapa 8).
10. Centrifugue a coluna a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 2 min para promover a secagem completa da membrana de sílica. Em seguida, mantenha a coluna Spin à temperatura ambiente por 2 a 5 min para secagem ao ar e evaporação do solvente residual.
 - *Nota:* Traços residuais de etanol no Tampão de Lavagem podem atuar como inibidores em ensaios enzimáticos subsequentes (*downstream*).
11. Transfira a coluna Spin para um microtubo estéril e livre de nucleases de 1,5 mL. Pipete de 50 a 200 μL do Tampão de Eluição ou água ultrapura deionizada diretamente no centro da membrana de sílica. Incube à temperatura ambiente por 2 a 5 min e centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 2 min para a eluição do DNA.
 - *Nota:* Volumes de eluição inferiores a 50 μL podem reduzir a eficiência de recuperação do material. O pH do tampão de eluição afeta criticamente a dessorção do DNA; recomenda-se utilizar o Tampão de Eluição ou água ultrapura com faixa de pH ajustada entre 7,0 e 8,5. Para o armazenamento do DNA em longo prazo, recomenda-se o uso do Tampão de Eluição e estocagem a -30°C a -15°C , prevenindo a hidrólise ácida inerente ao armazenamento prolongado em água. Para maximizar o rendimento de gDNA, o eluato pode ser reaplicado sobre a membrana da coluna Spin, incubado à temperatura ambiente por 2 min e centrifugado novamente a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 2 min.

Análise de Concentração e Pureza do DNA

O tamanho fragmentar do DNA genômico (gDNA) isolado depende diretamente das condições de conservação da amostra biológica e das forças de cisalhamento mecânico aplicadas durante a manipulação do protocolo. O DNA purificado pode ser quantificado e qualificado por eletroforese em gel de agarose e por espectrofotometria na região do UV.

- Espectrofotometria no UV: O DNA apresenta absorvância máxima no comprimento de onda de $\lambda = 260 \text{ nm}$ (A_{260}). Uma unidade de A_{260} equivale à concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ para DNA fita dupla (dsDNA) e 40 $\mu\text{g/mL}$ para DNA fita simples (ssDNA).
- Razão de Pureza (A_{260}/A_{280}): A razão espectrofotométrica A_{260}/A_{280} para uma amostra de DNA purificado deve situar-se no intervalo de 1,7 a 1,9. O uso de água deionizada (ddH_2O) na eluição pode resultar em valores de razão inferiores aos esperados, uma vez que o pH e a força iônica do meio influenciam diretamente o espectro de absorvância do ácido nucleico.

Apenas para uso em pesquisa, não para diagnóstico clínico.

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
- Rev 0.1 (julho/2026)