

miRNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-601

Armazenamento: Tampão de lise : 2-8°C. Demais tampões e componentes : ambiente

Descrição:

Este produto é indicado para o isolamento de miRNAs e RNA total a partir de cultivos celulares, tecidos, sangue total fresco e exossomos. Após a lise, a adição de clorofórmio promove a separação de fases, resultando em uma fase aquosa superior incolor (contendo o RNA), uma interfase e uma fase orgânica inferior rosada. A adição de etanol à fase aquosa transferida permite a imobilização específica do RNA total em colunas de centrifugação. A modulação do volume de etanol adicionado à fase aquosa possibilita o fracionamento seletivo: RNAs de alto peso molecular (incluindo rRNAs 28S e 18S, além de mRNAs) são retidos na matriz de sílica, enquanto RNAs de baixo peso molecular (≤ 200 nt, como miRNAs, siRNAs, shRNAs e snRNAs) permanecem no efluente (flow-through). Subsequentemente, a adição de um volume complementar de etanol ao efluente permite a imobilização e recuperação dos miRNAs em uma coluna específica. O produto exibe elevada eficiência de lise, alto rendimento e ampla aplicabilidade experimental.

Aplicação:

Deteção de DNA de animais, plantas e microrganismos por PCR quantitativa de fluorescência de sonda.

Componentes do kit

Componente	Volume
Tampão de Lise (manter em temperatura de 2-8°C)	55ml
Tampão de Lavagem	12ml
Tubos e Colunas (RNAspin)	50 unid.
Tubos e Colunas (miRNA)	50 unid.
Tubos RNase-free	50 unid.
Água RNase-free	10ml

Amostras

Tipo de Amostra	Quantidade
Tecido	50-100mg
Células	1×10^7 células
Sangue fresco/Exossomo	5-200µl

Preparativos Prévios e Reagentes Requeridos

- Ajuste de Equipamento:** Pré-resfrie a centrífuga refrigerada à temperatura de 2 a 8 °C.

- **Preparo de Tampão:** Adicione 48 mL de etanol absoluto ao Tampão de lavagem antes do primeiro uso.
- **Reagentes Adicionais Necessários:** Clorofórmio e etanol absoluto.

Processamento de Amostras:

1. Homogeneização

a. Células Aderentes

- Descarte o meio de cultura e lave a placa de cultivo uma vez com Tampão PBS1X.
- Adicione o Tampão de Lise à placa de cultivo na proporção de 1 mL para cada 10 cm² de área de superfície. Mantenha a placa em posição horizontal para garantir a distribuição homogênea do tampão e a lise celular.
- Desprenda e ressuspensa as células por pipetagem (para linhagens de forte adesão, utilize um raspador celular/*cell scraper*).
- Transfira o lisado celular para um tubo de microcentrifuga. Homogeneíze por pipetagens repetidas até a completa clarificação do lisado (ausência de precipitados visíveis).
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

b. Células em Suspensão

- Transfira a suspensão celular (células e meio de cultura) para um tubo de microcentrifuga. Centrifugue a 8000xg por 2 minutos a 2–8 °C e descarte o sobrenadante.
- Adicione o Tampão de Lise ao *pellet* celular na proporção de 1 mL para cada 1×10^7 células.
- Homogeneíze por pipetagens repetidas até a dissolução completa de agregados celulares e precipitados.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

c. Tecidos Animais e Vegetais

- Após a pesagem das amostras conservadas em ultra-baixa temperatura, transfira-as rapidamente para um recipiente previamente resfriado com nitrogênio líquido.
- Pulverize o tecido até a obtenção de um pó fino e homogêneo, adicionando nitrogênio líquido suplementar conforme necessário (a trituração incompleta compromete diretamente o rendimento e a integridade do RNA).

Continuando o Processamento de Amostras:

- Transfira o tecido em pó para um tubo de microcentrifuga livre de RNases. Adicione o Tampão de Lise na proporção de 1 mL para cada 50–100 mg de tecido. Homogeneíze o tecido utilizando um homogeneizador mecânico ou ressuspensando vigorosamente por pipetagem até obter a completa uniformização.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

d. Sangue Total

- Adicione o Tampão de Lise à amostra de sangue na proporção de 1 mL para até 200 μ L de sangue total e homogeneíze por agitação em *vortex*.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

e. Exossomos

- Ressuspenda a fração de exossomos em 100 μ L de Tampão PBS, adicione 1 mL do Tampão de Lise e homogeneíze em *vortex*.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

Separação de Fases e Extração

2. Adicione 0,2 mL de clorofórmio para cada 1 mL de Tampão de Lise utilizado. Agite o tubo vigorosamente em *vortex* por 30 segundos. Incube à temperatura ambiente por 3 minutos.
3. Centrifugue a amostra 12.000xg por 15 minutos a 2–8 °C. A mistura se dividirá em uma fase orgânica inferior rosada, uma interfase proteica/genômica e uma fase aquosa superior incolor contendo o RNA. O volume da fase aquosa equivale a aproximadamente 1/2 a 3/5 do volume inicial do Tampão de Lise.

Nota de Manuseio: Para evitar contaminação com DNA genômico decorrente do aspiramento acidental da interfase, recomenda-se deixar uma fração residual da fase aquosa no tubo.

4. Transfira cuidadosamente a fase aquosa incolor para um novo tubo livre de RNases. A partir deste ponto, o fracionamento para obtenção de **miRNA** ou **RNA total** pode ser conduzido por dois protocolos distintos. Todas as etapas de centrifugação subsequentes podem ser realizadas à temperatura ambiente.

Protocolo A: Purificação de miRNA

1. Adicione 1/3 de volume de etanol absoluto à fase aquosa transferida (ex.: para 500 μ L de fase aquosa, adicione 167 μ L de etanol absoluto). É esperada a formação pontual de precipitados. Homogeneíze por inversão suave do tubo.
2. Transfira todo o volume (solução e eventuais precipitados) para a coluna de centrifugação de RNA (*RNA Spin Column*). Centrifugue a 12.000xg por 30 segundos à temperatura ambiente e **colete o efluente** (*flow-through*).
3. Meça o volume do efluente e transfira-o para um tubo livre de RNases de 1,5 mL ou 2,0 mL. Adicione 1,25 volumes de etanol absoluto (ex.: adicione 812,5 μ L de etanol absoluto para 650 μ L de efluente). Homogeneíze por inversão suave.
4. Transfira todo o conteúdo para a coluna de centrifugação de miRNA (*miRNA Spin Column*). Centrifugue a 12.000xg por 30 segundos à temperatura ambiente e descarte o efluente. (*Caso o volume total exceda a capacidade máxima da coluna, repita a aplicação em etapas até carregar todo o volume*).
5. Adicione 500 μ L do Tampão de Lavagem à coluna (certifique-se prévia e rigorosamente de que o etanol absoluto foi adicionado ao frasco). Centrifugue a 12.000xg por 30 segundos e descarte o efluente.

6. Repita a etapa (5) mais uma vez.
7. Centrifugue a $12.000 \times g$ por 2 minutos à temperatura ambiente para a remoção completa de resíduos de etanol.
8. Transfira a coluna de miRNA para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL livre de RNases. Aplique de 30 a 50 μL de água livre de nucleases (RNase-free Water) diretamente no centro da matriz de sílica. Incube à temperatura ambiente por 1 minuto.
9. Centrifugue a $12.000\times g$ por 1 minuto para eluir o miRNA purificado.
10. Armazene o miRNA isolado em ultrafreezer a -80°C .

Protocolo B: Purificação de RNA Total

1. Adicione 1,25 volumes de etanol absoluto à fase aquosa transferida (ex.: para 500 μL de fase aquosa, adicione 625 μL de etanol absoluto). Homogeneíze por inversão suave.
2. Transfira todo o volume para a coluna de centrifugação de RNA (*RNA Spin Column*). Centrifugue a $12.000\times g$ por 30 segundos à temperatura ambiente e descarte o efluente. *(Caso o volume exceda a capacidade da coluna, repita a aplicação em etapas).*
3. Adicione 500 μL do Tampão de Lavagem à coluna. Centrifugue a $12.000\times g$ por 30 segundos e descarte o efluente.
4. Repita a etapa (3) mais uma vez.
5. Centrifugue a $12.000 \times g$ por 2 minutos à temperatura ambiente para remover resíduos de etanol.
6. Acople a coluna de RNA a um tubo de 1,5 mL livre de RNases. Aplique 100 μL de água livre de nucleases no centro da matriz e incube à temperatura ambiente por 1 minuto.
7. Centrifugue a $12.000\times g$ por 2 minutos para eluir o RNA total.
8. Armazene o RNA total isolado em ultrafreezer a -80°C .

Observações Técnicas Importantes

- A homogeneização em *vortex* imediatamente após a adição de clorofórmio é um parâmetro crítico para garantir o rendimento e a eficiência da separação de fases.
- Certifique-se de que todos os reagentes orgânicos (clorofórmio, etanol absoluto) e insumos consumíveis (tubos de microcentrífuga, ponteiras) sejam estritamente **livres de RNases** (*RNase-free*).

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