

GENOMIC PURIFICATION DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-305

Armazenamento: temperatura ambiente

Descrição:

Este kit emprega um método enzimático para lise celular e utiliza colunas de centrifugação com membrana de sílica para o alinhamento e ligação específica ao DNA. É indicado para a extração eficiente de DNA genômico (gDNA) a partir de diversas matrizes biológicas (células e tecidos animais, caudas de camundongos, *Escherichia coli* e leveduras). O DNA purificado apresenta qualidade adequada para aplicações a jusante (downstream), tais como digestão enzimática, reação em cadeia da polimerase (PCR) e Southern Blot.

Características:

- Alta Eficiência e Rendimento: Processo de extração rápido com rendimento de até 15 µg.
- Elevada Integridade do gDNA: Condições de lise brandas, isentas de rompimento físico, minimizam a fragmentação mecânica do DNA genômico durante a clivagem celular.
- Alta Pureza: As colunas de centrifugação garantem a retenção seletiva do DNA, promovendo a remoção eficaz de proteínas, sais, lipídios e outros contaminantes interferentes.

Conteúdo do kit:

Componente	Volume
Buffer de Lise (LB2)	6ml
Buffer de Ligação (BB2)	28ml
Buffer de Limpeza (CB2)	15ml
Buffer de Lavagem (WB2)	12ml
Buffer de Eluição (EB)	25ml
Proteinase K (20mg/ml)	1ml
Genomic Spin com tubos	50 unid.

Requerimento das amostras

Tipo de Amostra	Quantidade
Células de mamíferos	1-5x10 ⁶ células
Tecidos	≤25mg
Cauda de camundongo/rato	0,5 cm
<i>E. coli</i>	≤2x10 ⁹ células
Levedura	≤5x10 ⁷ células

Procedimentos antes do uso

*Antes de iniciar, adicione volumes específicos de etanol 100% aos tampões CB2 e WB2

Componente	Volume
Buffer de Limpeza (CB2)	15ml
Buffer de Lavagem (WB2)	48ml

Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente.

Protocolo Experimental

- Células de Mamíferos

a) Células Aderentes: Descarte o meio de cultura da placa e proceda com a ressuspensão por tripsinização ou método equivalente. Centrifugue as células a 250xg por 5 minutos e remova completamente o sobrenadante.

b) Células em Suspensão: Recupere a suspensão celular e centrifugue a 250xg por 5 minutos. Descarte o sobrenadante.

c) Adicione 100µL do Tampão de Lise (LB2) ao pellet formado. Homogeneize completamente a suspensão por agitação em vortex ou por pipetagem repetida.

d) Adicione 20 µL de Proteinase K ao lisado. Homogeneize por agitação em vortex e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

- Tecidos de Mamíferos

Preparação prévia: Pré-aqueça um banho-maria ou bloco térmico (*dry-block*) a 55 °C.

a) Transfira ≤ 5 mg (para baço, ≤ 10 mg) de tecido picado para um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 mL.

b) Adicione 10 µL do Tampão Buffer de Lise (LB2) e 20µL de Proteinase K ao tubo. Certifique-se de que o tecido esteja completamente imerso na solução.

c) Incube a 55 °C até a lise completa da amostra (geralmente 3 horas para a maioria dos tecidos; 6 a 8 horas ou mais para caudas de camundongo. Se necessário, incube durante uma noite. Inverta o tubo de 2 a 3 vezes a cada hora).

Etapa Opcional (Digestão de RNA): Caso necessite de DNA genômico isento de RNA, adicione 20 µL de RNase A (20mg/ml) ao lisado e incube à temperatura ambiente por 2 minutos (não fornecido)

d) Centrifugue a 12.000xg por 5 minutos e transfira o sobrenadante para um tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 mL.

- *Escherichia coli*

Preparação prévia: Pré-aqueça um banho-maria ou bloco térmico a 55 °C.

a) Transfira 1-5 mL da cultura bacteriana para um tubo de 1,5 mL e centrifugue a 12.000xg por 1 minuto. Descarte o sobrenadante o mais completamente possível.

b) Adicione 100µL de Tampão de Lise (LB2) e 2 µL de Proteinase K ao tubo. Ressuspenda o *pellet* celular por agitação em vortex.

c) Incube a 55 °C por 15 minutos.

Etapa Opcional (Digestão de RNA): Caso necessite de DNA genômico isento de RNA, adicione 20 µL de RNase A (20mg/ml) à amostra e incube à temperatura ambiente por 2 minutos (não fornecido).

- Células de Levedura

Obs: Reagente necessário não fornecido (Liticase e reagentes para preparo da solução de sorbitol)

Preparação prévia:

- Pré-aqueça os banhos-maria ou blocos térmicos a 37 °C e 55 °C.

- Prepare o tampão de sorbitol fresco (1M Sorbitol, 10mM EDTA, 14mM β-mercaptoetanol) e a solução de liticase.

a) Colete as células de levedura ($\leq 5 \times 10^7$ células) por centrifugação a 12.000xg por 1 minuto. Descarte o sobrenadante o mais completamente possível.

b) Adicione 500 µL de tampão de sorbitol e 15 unidades de liticase ao *pellet*. Homogeneize completamente e incube a 37 °C por 1 hora.

c) Centrifugue a 5.000xg por 10 minutos e descarte o sobrenadante.

d) Ressuspensa o *pellet* adicionando 100µL de Tampão LB2 e 20 µL de Proteinase K. Homogeneize por agitação em *vortex*.

e) Incube a 55 °C por 45 minutos.

f) Centrifugue a 12.000xg por 5 minutos e transfira o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL.

Etapa Opcional (Digestão de RNA): Caso necessite de DNA total isento de RNA, adicione 20 µL de RNase A ao lisado e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

- **Protocolo de Purificação do DNA (Etapas Comuns)**

2. Adicione 500 µL do Tampão BB2 e homogeneize imediatamente por agitação em *vortex* durante 5 segundos. Incube à temperatura ambiente por 10 minutos.

3. Transfira todo o volume do lisado para a coluna de centrifugação com membrana de sílica. Centrifugue a 12.000xg por 30 segundos. Descarte o efluente (*flow-through*).

4. Adicione 500 µL do Tampão CB2 (certifique-se de ter adicionado etanol ao frasco antes do uso) e centrifugue a 12.000xg por 30 segundos. Descarte o efluente.

5. Adicione 500 µL do Tampão WB2 (certifique-se de ter adicionado etanol ao frasco antes do uso) e centrifugue a 12.000xg por 30 segundos. Descarte o efluente.

6. Repita o Passo 5 mais uma vez.

7. Centrifugue a 12.000xg por 2 minutos para remover completamente qualquer resíduo do Tampão WB2.

8. Transfira a coluna para um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. Aplique 50–200 µL do Tampão de Eluição (pré-aquecido a 60–70 °C) ou água desionizada estéril (pH > 7,0, pré-aquecida a 60–70 °C) diretamente no centro da membrana de sílica. Incube à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugue a 12.000xg por 1 minuto para eluir o DNA.

9. Para otimizar o rendimento, repita o Passo 8 uma vez.

10. Armazene o DNA isolado a -20 °C.

Observações Técnicas

- Capacidade da Coluna: É fundamental não ultrapassar a capacidade máxima de carga da coluna de sílica para não comprometer a eficiência da extração e a pureza do amostrado.

- Preparo de Tecidos: Fragmente o tecido no menor tamanho possível antes da digestão. Após a lise completa, o lisado deve apresentar aspecto viscoso, e não gelatinoso.

- Integridade das Amostras: Para garantir a integridade do DNA isolado, utilize amostras frescas e evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. A qualidade do DNA obtido varia de acordo com o tipo de matriz biológica e o tempo de armazenamento.

- Contaminações: Utilize tubos e ponteiros estéreis (livres de DNase) para evitar a degradação enzimática do DNA.

- Eluição: A utilização do mesmo tubo de coleta ou de um novo tubo para a segunda etapa de eluição fica a critério do operador.

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