

## MIX PARA GENOTIPAGEM DIRETA

**Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar**

**Cat. No. XP-501**

**Armazenamento: -20°C**

### Descrição:

O MIX PARA GENOTIPAGEM DIRETA utiliza um tampão de lise exclusivo formulado para a extração rápida de DNA genômico a partir de fragmentos de tecidos frescos ou criopreservados (como espécimes de orelha ou cauda), resultando em um produto pronto para PCR. O reagente de alta eficiência 2X SuperMix (+corante) foi desenvolvido para neutralizar de forma eficaz os agentes inibitórios presentes no lisado bruto, garantindo a integridade da amplificação por PCR.

### Aplicações:

- Amplificação direta via PCR: Processamento a partir de lisados brutos, eliminando etapas de purificação de DNA.
- Genotipagem rápida: Otimizado para protocolos de triagem de camundongos baseados em PCR de alto desempenho.
- Escalabilidade: Protocolo simplificado, ideal para aplicações de alta vazão (high-throughput).
- PCR Multiplex

### Conteúdo do kit:

| Componente    | XP-501 (100 reações) |
|---------------|----------------------|
| Tampão 1 (T1) | 12ml                 |
| Tampão 2 (T2) | 3ml                  |
| 2X SuperMix   | 1ml                  |
| 10X GC        | 1ml                  |
| Água          | 5ml                  |

## Procedimentos:

### A: Preparação do Template (Molde)

1. Preparação do Tampão de Lise: Adicione 120µl de tampão T1 e 30µl de tampão T2 em um tubo de PCR. Para o processamento de múltiplas amostras, prepare uma solução de trabalho (*premix*) combinando os tampões T1 e T2 na proporção de 4:1. Esta mistura permanece estável por até 2 horas em temperatura ambiente.
2. Inoculação da Amostra: Insira o fragmento de tecido de camundongo na mistura T1/T2 e homogeneíze cuidadosamente por meio de pipetagem. As dimensões recomendadas são:
  - Tecido auricular (orelha): Fragmento circular de 3mm (2,5-6mg) de diâmetro (via *punch*) ou dimensões equivalentes por corte.
  - Tecido digital (dedo): Aproximadamente 2mm ((2,5-6mg) - (excluindo a garra/unha).
  - Tecido caudal (cauda): Aproximadamente 2mm (2,5-6mg) da extremidade distal.
3. Lise Térmica: Transfira os tubos para um termociclador (com tampa aquecida devidamente configurada). Incube a 55°C por 10 minutos para a digestão tecidual, seguido de inativação térmica a 95°C 3 minutos.
  - *Nota: Caso a amostra não tenha sido triturada ou possua um volume excessivo, o tempo de incubação a 55°C pode ser estendido, não devendo ultrapassar o limite de 2 horas.*
4. Armazenamento do Lisado: O lisado bruto obtido pode ser utilizado diretamente como molde para a PCR. Para conservação, armazene a 2-8°C por curto prazo ou a -20°C por longo prazo.

### Amplificação por PCR

| Componente            | Volume   | Concentração Final |
|-----------------------|----------|--------------------|
| Lisado Não purificado | 0,5-4 µl | -                  |
| Primer Forward (10µM) | 0,4 µl   | 0,2µM              |
| Primer Reverso (10µM) | 0,4 µl   | 0,2µM              |
| 2X SuperMix           | 10 µl    | 1x                 |
| Água                  | Variável | -                  |
| Volume Total          | 20 µl    | -                  |

### Condições da Amplificação

| Temperatura | Tempo         | Ciclos       |
|-------------|---------------|--------------|
| 94°C        | 5-10 minutos  | 35-40 ciclos |
| 94°C        | 30 segundos   |              |
| 50-60°C     | 45 segundos   |              |
| 65°C        | 0,5-1 kb/min* |              |
| 65°C        | 5-10 minutos  |              |

\* Para PCR multiplex, sugerimos utilizar o tempo de extensão (a uma taxa de 0,5 kb/min) de acordo com o maior fragmento.

#### Notas:

- **Massa de Amostra:** Evite o uso de quantidades excessivas de tecido para prevenir a lise incompleta da amostra e a consequente redução na pureza do template.
- **Estabilidade do Lisado:** O lisado bruto mantém sua viabilidade sob 2-8°C por até três meses, ou a -20°C por aproximadamente seis meses.
- **Conservação do Reagente:** Se necessário, armazene o Tampão T1 a 2-8°C por até 1 mês por até 1 mês, visando mitigar os danos causados por ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento.
- **Resolução Eletroforética:** Para a distinção de produtos de PCR multiplex com massas moleculares semelhantes, recomenda-se a utilização de géis de agarose em alta concentração para otimizar a resolução das bandas.
- **Otimização do Template:** Embora o uso de 1µl ou 2µl de lisado geralmente apresente resultados satisfatórios, recomenda-se a titulação do template para a otimização da eficiência da reação.
- **Refinamento do Ensaio:** Para otimizar os resultados em PCR multiplex, além do ajuste da temperatura de anelamento (*annealing*), da concentração do molde e da proporção dos iniciadores (*primers*), pode-se considerar a suplementação da reação com agentes intensificadores (*enhancers*) em concentração final adequada.

**Apenas para uso em pesquisa, não para diagnóstico clínico.**

#### Contatos:

- **Website:** [www.genexplore.com.br](http://www.genexplore.com.br)
- **E-mail:** [suporte@genexplore.com.br](mailto: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