

GEL UNIVERSAL DNA PURIFICATION KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-219

Armazenamento: temperatura ambiente

Descrição:

O GEL UNIVERSAL DNA PURIFICATION KIT utiliza uma matriz de sílica que viabiliza a adsorção específica e de alta eficiência do DNA. O sistema permite a recuperação de fragmentos de DNA a partir de géis de agarose (preparados em tampões TAE ou TBE), eliminando contaminantes como proteínas, compostos orgânicos, íons salinos inorgânicos e oligonucleotídeos iniciadores (primers).

O método é indicado para a purificação de fragmentos de DNA na faixa de 100 pb a 15 kb, apresentando rendimento de recuperação de até 80%. Cada coluna de centrifugação possui capacidade de ligação de até 10 µg de DNA. O material genético eluído apresenta alta pureza, sendo adequado para aplicações subsequentes (downstream), tais como digestão enzimática, PCR, sequenciamento, triagem de bibliotecas genômicas, reação de ligação e transformação bacteriana.

Características:

Rapidez: O protocolo operacional é altamente dinâmico e simplificado, com tempo de execução estimado em até 12 minutos.

Versatilidade: O sistema é compatível com a recuperação de fragmentos de DNA de fita simples (ssDNA), fita dupla (dsDNA) e DNA plasmidial circular.

Eficiência: A associação de colunas de centrifugação exclusivas a tampões de formulação específica garante a máxima recuperação de DNA com elevado grau de pureza.

Notas Importantes

1. Condições do Tampão de Corrida: Utilize tampão de eletroforese recém-preparado para evitar alterações na migração eletroforética e decréscimo na eficiência de recuperação.
2. Escolha do Tampão: Recomenda-se a utilização de tampão TAE caso as aplicações subsequentes (downstream) exijam alto rigor de pureza e rendimento.
3. Centrifugação: Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas em centrífuga de bancada sob temperatura ambiente.
4. Exposição ao UV: Durante a excisão da banda do gel, minimize o tempo de exposição à radiação ultravioleta para prevenir a fotodegradação e danos estruturais ao DNA.

5. Ajuste de pH: Em casos de baixo rendimento de recuperação, verifique o pH após a completa solubilização do gel. Se o pH for superior a 7,5, adicione de 10 a 30 µL de acetato de sódio (CH₃COONa) 3 M (pH 5,2) à mistura até que o pH retorne à faixa ideal de 5,0 a 7,0.
6. Rendimento: A eficiência de recuperação é diretamente proporcional à quantidade inicial de DNA e ao volume de eluição empregado. Amostras com baixa concentração inicial de DNA ou eluídas em volumes muito reduzidos apresentarão menor taxa de recuperação.

Reagentes fornecidos pelo usuário:

- Etanol 96-100%
- Acetato de sódio (CH₃COONa) 3 M (pH 5,2)

Conteúdo do kit:

Componente	XP219-02 (50 preparações)	XP219-05 (250 preparações)
Buffer PE	50 ml	200ml
Buffer PW	15ml	50ml
Buffer TB	15ml	30ml
Spin Columns CA5	50 unid.	200 unid.
Collection Tubes 2ml	50 unid.	200 unid.
Gel cutter	5 unid.	20 unid.

Protocolo Experimental

- **Procedimento Preliminar**

Adição de Etanol: Adicione etanol absoluto (96-100%) ao Tampão PW antes do primeiro uso (verifique o volume indicado no rótulo do frasco).

- **Protocolo Experimental**

1. Corte do Gel de Agarose ou Preparação do Produto de PCR

- **Corte do Gel:** Clive a banda de DNA de interesse do gel de agarose (removendo o excesso de agarose adjacente para minimizar o volume do fragmento). Transfira o fragmento para um microtubo de centrifugação estéril e determine a massa do gel.
- **Produto de PCR:** Para a purificação direta de produtos de PCR (sem corrida em gel), prossiga diretamente para a **Etapa 2**.

Nota sobre o uso do Cortador de Gel (Gel Cutter): Alinhe a extremidade do cortador à banda de DNA alvo no gel de agarose e pressione para realizar a clivagem. Em seguida, acione o êmbolo central para transferir o fragmento de gel para o microtubo de centrifugação. O procedimento pode ser realizado por corte único ou contínuo, dependendo da largura do poço do gel.

2. Solubilização do Gel ou Diluição do Produto de PCR

Adicione ao fragmento de gel (ou ao produto de PCR) um volume do Tampão PE correspondente a três vezes a massa do gel obtida (considerando a densidade padrão de $1\text{ g} = 1\text{ mL}$; ex: para 0,1 g de gel, adicione 300 μL de Tampão PE).

Incube a mistura em temperatura ambiente ($15\text{--}30^\circ\text{C}$) por 5 a 10 minutos, realizando inversões suaves e periódicas do tubo para homogeneização e completa solubilização da agarose. Para produtos de PCR, prossiga diretamente para a **Etapa 3**.

Notas Adicionais:

- Fragmentos obtidos por meio do *Gel Cutter* a partir de um gel de agarose a 1% apresentam massa aproximada de 0,06 g. A massa real do fragmento varia conforme a espessura e a concentração do gel. Caso o fragmento seja muito grande, fragmente-o em pedaços menores para facilitar a dissolução.

- Para fragmentos de DNA superiores a 5 kb ou concentrações de agarose acima de 1,5%, incube a mistura a 50°C por 5 a 10 minutos para garantir a solubilização. Aguarde o resfriamento da solução até a temperatura ambiente antes de transferi-la para a coluna de centrifugação CA5, pois a eficiência de adsorção do DNA à matriz de sílica é otimizada sob temperatura ambiente.

3. Adsorção do DNA à Coluna de Centrifugação

Transfira a solução obtida na Etapa 2 para uma coluna de centrifugação CA5 (previamente acoplada a um tubo de coleta) e incube em repouso por 2 minutos em temperatura ambiente. Centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 30 segundos. Descarte o eluato do tubo de coleta e reintroduza a coluna CA5 no mesmo tubo.

Nota: A capacidade máxima de carga da coluna é de 800 μL . Caso o volume total da amostra exceda esse limite, realize a transferência e centrifugação em etapas sucessivas (alíquotas).

4. Lavagem da Membrana

Adicione 600 μL de Tampão PW (previamente suplementado com etanol) à coluna CA5. Centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 30 segundos.

Descarte o filtrado (*flow-through*) do tubo de coleta e reintroduza a coluna de centrifugação CA5 no mesmo tubo.

Nota: Caso o DNA purificado seja utilizado em aplicações altamente sensíveis à concentração de sais, tais como reações de ligação de extremidades cegas (*blunt-end ligation*) ou sequenciamento direto, realize uma incubação em repouso de 2 a 5 minutos à temperatura ambiente após a adição do Tampão PW e antes de proceder à centrifugação.

5. Repetição da Lavagem

Repita o procedimento descrito na **Etapa 4** (segunda lavagem com Tampão PW).

6. Secagem da Membrana de Sílica

Reintroduza a coluna CA5 no tubo de coleta e centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 2 minutos para eliminar os resíduos de lavagem. Em seguida, incube a coluna aberta em temperatura ambiente por 2 a 5 minutos para garantir a evaporação completa do etanol residual, prevenindo interferências em etapas posteriores.

Nota: Resíduos de etanol provenientes do Tampão PW atuam como potentes inibidores de reações enzimáticas subsequentes, incluindo digestões com enzimas de restrição e PCR.

7. Eluição do DNA Purificado

Transfira a coluna CA5 para um microtubo de centrifugação estéril e livre de nucleases. Adicione um volume adequado do Tampão TB diretamente no centro da membrana de sílica e incube em temperatura ambiente por 2 minutos. Centrifugue a 12.000 rpm ($\approx 13.400 \times g$) por 2 minutos para eluir e coletar a solução contendo o DNA purificado.

Notas Adicionais sobre a Eluição:

- **Volume Mínimo:** O volume de eluição não deve ser inferior a 30 μ L, sob risco de redução significativa no rendimento de recuperação.

- **Influência do pH:** A eficiência de eluição é estritamente dependente do pH do eluente. Caso o DNA seja destinado ao sequenciamento, utilize água ultrapura livre de nucleases (ddH₂O) como eluente, certificando-se de que o pH esteja na faixa de 7,0 a 8,5 (valores de pH < 7,0 reduzem drasticamente a desorção do DNA). Armazene o DNA eluído a -20°C para evitar a degradação térmica ou enzimática. Alternativamente, o DNA pode ser eluído em Tris-HCl 10 mM (pH 8,0).

- **Maximização do Rendimento:** Para otimizar a recuperação de DNA, o eluato obtido pode ser reaplicado no centro da membrana da mesma coluna CA5, seguido de incubação por 2 minutos em temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 rpm por mais 2 minutos.

Determinação da Concentração e Pureza do DNA

A quantificação e a avaliação da integridade dos fragmentos de DNA recuperados podem ser realizadas por eletroforese em gel de agarose ou por espectrofotometria de absorção no ultravioleta (UV).

- **Absorbância no UV:** O DNA apresenta pico de absorbância característico em comprimento de onda de 260 nm (A_{260}). Uma unidade de absorbância ($A_{260} = 1$) equivale a aproximadamente 50 μ g/mL de DNA de fita dupla (dsDNA) ou 40 μ g/mL de DNA de fita simples (ssDNA).
- **Razão de Pureza:** A razão de absorbância A_{260}/A_{280} ideal para DNA altamente purificado situa-se entre 1,7 e 1,9. Caso a eluição seja realizada em ddH₂O em substituição ao tampão de eluição, essa razão pode apresentar valores discretamente inferiores devido à ausência de força iônica e variações de pH que influenciam o perfil de absorção de luz, sem que isso represente, necessariamente, uma redução real na pureza da amostra.

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)