

SOIL DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-336

Armazenamento: 15°-30°C.

Se algum precipitado se formar nos tampões, ele deve ser dissolvido aquecendo os tampões a 37°C antes do uso.

Descrição:

O SOIL DNA KIT emprega um sistema de tamponamento exclusivo otimizado para a remoção exaustiva de ácidos húmicos, potentes inibidores de polimerases presentes em matrizes edáficas. O protocolo integra o uso de esferas de trituração de 1 mm para promover a lise mecânica eficiente dos componentes da amostra, assegurando a obtenção de DNA genômico (gDNA) com elevada integridade estrutural.

O DNA isolado apresenta altos índices de pureza e rendimento, constituindo um molde de excelência para aplicações moleculares posteriores, tais como amplificação via PCR e digestão por enzimas de restrição.

Características do Produto:

- Versatilidade de Matrizes: Eficácia comprovada no isolamento de gDNA em diversos tipos de solo, incluindo solos de canteiros, solos agrícolas, solos florestais, lodo, latossolos (terra vermelha), chernossolos (terra preta), sedimentos e poeira.
- Eficiência Operacional: Fluxo de trabalho otimizado que permite a conclusão do procedimento experimental em intervalos de tempo reduzidos.
- Elevada Pureza: A utilização da tecnologia de coluna de sílica (spin column) garante a obtenção de gDNA purificado, livre de contaminantes e resíduos proteicos.

Notas Técnicas e Precauções Importantes:

- Viabilidade da Amostra: O uso de amostras frescas correlaciona-se a maiores rendimentos. Recomenda-se verificar as condições ideais de armazenamento específicas para cada tipo de solo antes da coleta.

- Parâmetros de Centrifugação: Todas as etapas de centrifugação devem ser executadas em microcentrífugas de bancada convencionais, sob temperatura ambiente (15-30°C).

- Integridade da Coluna: Evite a aspiração de precipitados durante a coleta dos sobrenadantes. A transferência de detritos pode causar a colmatção (entupimento) da coluna, comprometendo a pureza do eluato final.

- Preparação de Reagentes: **É imprescindível a adição de 15ml de etanol absoluto ao Tampão PWS antes da utilização inicial.**

- Otimização de Downstream: Concentrações excessivas de gDNA podem atuar como inibidores da reação de PCR. Em casos de rendimento supra-ótimo, recomenda-se a diluição da amostra para atingir a concentração ideal de trabalho.

Componentes do kit

Componente	Volume
Tampão de Lise I	45ml
Tampão de Lise II	5ml
Tampão de Remoção de Inibidores I	15ml
Tampão de Remoção de Inibidores II	15ml
Tampão de Ligação	70ml
Tampão de Lavagem (adicionar 15ml de etanol 100%)	15ml
Tampão de Eluição	15ml
Beads	15g
Colunas Spin	50 unid.
Tubos de Coleta	50 unid.

Protocolo:

Preparação Prévia: Certifique-se de que o Tampão de Lavagem foi devidamente suplementado com 15ml de Etanol Absoluto.

1. Preparação da Amostra: Adicione 750 µl do Tampão de Lise I e 0,25 g de Esferas de Trituração (Beads) em um tubo de microcentrifuga de 2 ml.
2. Homogeneização Inicial: Transfira 0,25 g da amostra de solo para o tubo e proceda à homogeneização via vórtex por 15 segundos.
3. Lise Celular: Adicione 60 µl do Tampão de Lise II e submeta a amostra à agitação em vórtex por 10 minutos.

Nota: Inspeção o Tampão de Lise II quanto à presença de precipitados. Caso necessário, proceda à redissolução por incubação em banho-maria a 37°C.

4. Clarificação do Lisado: Centrifugue a amostra a 12.000 rpm (~13.400 × g) por 1 minuto. Transfira cuidadosamente o sobrenadante (aproximadamente 500 µl) para um novo tubo de microcentrifuga de 2 ml.
5. Precipitação de Inibidores (Fase I): Adicione 250 µl do Tampão de Remoção de inibidores I, homogeneíze brevemente (5 segundos) e incube a amostra a 4°C por 5 minutos.
6. Precipitação de Inibidores (Fase II): Centrifugue a 12.000 rpm por 1 minuto. Transfira o sobrenadante para um novo tubo, adicione 200 µl do Tampão de Remoção de Inibidores II e incube novamente a 4°C por 5 minutos.

Nota: Evite a aspiração de partículas do sedimento durante a transferência, visando garantir a máxima pureza do eluato.

7. Condicionamento da Amostra: Centrifugue a 12.000 rpm por 1 minuto e transfira o sobrenadante para um novo tubo. Adicione 1.200 µl do Tampão GF e homogeneíze por inversão.
8. Adsorção à Coluna de Sílica: Transfira 700 µl da mistura obtida no passo 7 para a coluna Spin. Centrifugue a 12.000 rpm por 30 segundos, descarte o filtrado e reinsira a coluna no tubo de coleta.

Nota: A capacidade nominal da coluna é de 700 µl; processe o volume excedente em alíquotas sucessivas na mesma coluna.

9. Lavagem I: Adicione 500 µl do Tampão de Lavagem (previamente suplementado com etanol) à coluna. Centrifugue a 12.000 rpm por 30 segundos e descarte o filtrado.
10. Lavagem II: Adicione 500 µl de etanol 70% à coluna. Centrifugue a 12.000 rpm por 30 segundos e descarte o filtrado.
11. Secagem da Matriz: Centrifugue a coluna vazia a 12.000 rpm por 2 minutos para a remoção total de resíduos de etanol.

12. Eluição do DNA: Incube a coluna em temperatura ambiente (15-30°C) por alguns minutos para a evaporação de solventes residuais. Transfira a coluna para um tubo de coleta estéril e aplique 50–100 µl de Tampão de Eluição diretamente no centro da membrana de sílica. Incube por 2 a 5 minutos e centrifugue a 12.000 rpm por 2 minutos para eluir e coletar o DNA genômico purificado.

Notas:

1. Visando melhorar a concentração final de DNA, o eluato (filtrado) pode ser reintroduzido na Coluna Spin.
2. Após a re-aplicação, incube a coluna em temperatura ambiente por 2 minutos, seguida de uma nova centrifugação a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos.
3. A eficiência da eluição é estritamente dependente do potencial hidrogeniônico (pH). Caso utilize água destilada como agente de eluição, recomenda-se que o pH esteja na faixa de 7,0 a 8,5. Valores de pH ácidos ($\text{pH} < 7,0$) resultam em uma redução significativa na eficiência de dessorção do DNA da matriz de sílica.
4. Preservação: Para prevenir a degradação enzimática ou química, os ácidos nucleicos isolados devem ser mantidos sob congelamento a -20°C .
5. Análise de Concentração e Pureza do DNA e o peso molecular do gDNA extraído são influenciados pelas condições de armazenamento da amostra e pelas forças de cisalhamento (shearing) aplicadas durante o manuseio.
6. A avaliação do DNA purificado deve ser realizada via eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria de UV.
7. Quantificação Espectrofotométrica: O DNA apresenta um pico de absorbância característico em 260 nm. Uma densidade óptica OD_{260} equivalente a 1 corresponde a uma concentração de 50 µg/ml para DNA de fita dupla (dsDNA) e 40 µg/ml para DNA de fita simples (ssDNA).
8. Critérios de Pureza: A razão de absorbância $\text{OD}_{260/280}$ deve situar-se no intervalo de 1,7 a 1,9. Ressalta-se que a utilização de água deionizada para a eluição pode resultar em razões inferiores, uma vez que a ausência de íons e variações no pH influenciam diretamente as propriedades de absorção da molécula.

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