

GENOMIC TOTAL DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-304

Armazenamento: ambiente

Descrição:

O GENOMIC TOTAL DNA KIT baseia-se na tecnologia de adsorção em membrana de sílica, empregando um sistema de tampões específico para a extração e purificação de DNA genômico (gDNA) a partir de uma ampla variedade de matrizes biológicas. A coluna de centrifugação é composta por uma matriz de sílica de última geração, otimizada para a ligação seletiva do ácido desoxirribonucleico sob condições controladas de pH e força iônica. Etapas sequenciais de centrifugação garantem a eliminação completa de contaminantes celulares e inibidores enzimáticos, tais como proteínas residuais e cátions divalentes. O gDNA purificado é eluído em solução tampão de baixa salinidade ou em água livre de nucleases, apresentando-se pronto para aplicações subsequentes (downstream). O DNA obtido por este método demonstra alta integridade e pureza, sendo estritamente adequado para ensaios de digestão de restrição, amplificação por PCR, Southern blotting e construção de bibliotecas genômicas.

Destaques:

- Versatilidade de Aplicação: Método de escolha para a extração e purificação de DNA genômico a partir de tecidos animais, culturas celulares, sangue total e líquidos corporais.
- Eficiência Operacional: Protocolo otimizado e de execução célere, com tempo total de amostragem e isolamento estimado em 1 hora.
- Elevado Grau de Pureza: O eluato de DNA obtido apresenta alta integridade e qualidade analítica, atendendo aos rigorosos critérios de pureza exigidos em aplicações moleculares subsequentes (downstream).

Notas Importantes:

- Preparação dos Reagentes: Previamente ao primeiro uso, adicione etanol absoluto (96–100%) aos tampões Buffer GD e Buffer PW, seguindo estritamente os volumes indicados nos rótulos dos respectivos frascos.
- Preservação das Amostras: Deve-se evitar ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento das amostras biológicas, visto que este processo induz a fragmentação e o cisalhamento mecânico do DNA.

- Solubilização de Precipitados: Caso observe a formação de precipitados nos tampões Buffer GA ou Buffer GB, incube a solução em banho-maria ou estufa a 37°C até a completa redissolução dos cristais.

- Condições de Centrifugação: Todas as etapas de centrifugação devem ser executadas em microcentrífuga de bancada convencional, sob temperatura ambiente controlada (15–30°C).

Conteúdo do kit:

Componente	Volume
Buffer GA	15ml
Buffer GB	15ml
Buffer GD	13ml
Buffer PW	15ml
Buffer TE	15ml
Proteinase K	1ml
Spin Columns CB3	50
Collection Tubes 2ml	50

Rendimento do DNA:

Tipo de Amostra	Volume da Amostra	DNA (ug)
Sangue total de mamíferos	200-500ul	3-10
Sangue total de aves e anfíbios	5-20ul	5-40
Culturas celulares	10 ⁶ -10 ⁷ células	5-30
Tecidos animais	30mg	10-30
Cauda de camundongo	1,2cm	10-25
Cauda de rato	0,6cm	20-40
Swab Bucal	1	0,5-3,5µg

Reagentes requeridos pelo usuário (não fornecidos no kit):

- Etanol absoluto (96–100%)
- RNase A (100mg/ml)
- Tampão de Lise de Eritrócitos (opcional)

Procedimentos:

Preparo Prévio: Certifique-se de que os tampões Buffer GD e Buffer PW foram devidamente homogeneizados e diluídos com o volume apropriado de etanol absoluto (96–100%), conforme as instruções contidas nos respectivos frascos. Agite vigorosamente antes da utilização.

A. Sangue Total

1. Utilize uma alíquota de 200µl de sangue total (fresco, congelado ou homogeneizado com anticoagulante). Caso o volume amostral seja inferior a 200µl, complete o volume final para 200µl utilizando o Buffer GA.

B. Sangue de Espécies com Eritrócitos Nucleados (Aves e Anfíbios)

1. Devido à presença de núcleos nos eritrócitos destas classes de animais, a massa celular inicial deve ser reduzida. Utilize um volume de 5-20µl de sangue total e complete o volume final para 200µl com o Buffer GA.

C. Culturas Celulares (Células Aderentes)

1. Proceda inicialmente com a dissociação celular para a obtenção de uma suspensão homogênea. Centrifugue a suspensão a 10.000rpm (11,200xg) por 1 minuto, descarte o sobrenadante e ressuspenda o *pellet* celular em 20µl de tampão TE ou PBS (não fornecido). Adicione 180µl de Buffer GA para garantir a completa homogeneização e lise.

D. Tecidos Animais: Para fragmentos de tecidos (baço <10mg)

1. Realize previamente a homogeneização mecânica (lise tecidual). Centrifugue o homogeneizado a 10.000rpm (11.200xg) por 1 minuto. Descarte o sobrenadante e ressuspenda o *pellet* celular resultante em 200µl de Buffer GA.

E. Coleta de Células Epiteliais Bucais

Nota de Controle de Contaminação: A fim de mitigar interferências ou contaminações por resíduos alimentares e de bebidas, o indivíduo amostrado deve manter jejum oral (líquidos e sólidos) por no mínimo 30 minutos antecedentes à coleta.

1. Aliquote 400µl do Buffer GA em um microtubo de centrifugação de 2ml. Com o auxílio de uma tesoura estéril, seccione a extremidade da escova de coleta (swab), separando-a da haste, e insira a porção destacada diretamente no tubo contendo o tampão.

Nota para Isolamento de DNA Livre de RNA (Opcional): Caso seja necessária a eliminação de fitas de RNA interferentes, adicione 4µl de RNase A (100mg/mL) à amostra. Homogeneize em vortex por 15 segundos e incube a reação por 5 minutos em temperatura ambiente (15–30°C).

A Partir da Etapa 2, o protocolo é comum aos diferentes tipos de amostra.

2. Adicione 20µl de Proteinase K e homogeneize a solução por inversão ou agitação vigorosa.
 - **Para amostras de sangue total e culturas celulares:** Proceda imediatamente para a etapa 3.
 - **Para tecidos animais:** Incube a amostra a 56°C até a completa lise tecidual.
 - **Para amostras de swab:** Incubate a amostra 56°C for 60 minutos, agitando a cada 15 minutos.

Nota: O tempo de incubação varia conforme a matriz tecidual utilizada, demandando geralmente de 1 a 3 horas (amostras de cauda de rato requerem lise *overnight*). Recomenda-se a homogeneização por inversão do tubo 2 a 3 vezes a cada hora ou o uso de banho-maria com agitação orbital constante (*Shaking Water Bath*).

3. Adicione 200µl do Buffer GB à amostra, homogeneize vigorosamente e incube a 70°C por 10 minutos para a obtenção de uma solução translúcida e homogênea. Centrifuge brevemente o microtubo para precipitar as gotículas condensadas na parede interna da tampa.

Nota 1: No caso de swab: Comprima a matriz/haste para recuperar o máximo possível de volume do lisado celular e transfira a totalidade do sobrenadante para um microtubo de centrifugação limpo e estéril.

Nota 2: A adição do Buffer GB pode induzir a formação de um precipitado esbranquiçado. Este fenômeno não interfere no ensaio, e os cristais deverão solubilizar-se durante a incubação térmica a 70°C. A persistência de precipitados após o aquecimento indica lise celular incompleta, o que pode comprometer o rendimento e o grau de pureza do DNA isolado.

4. Adicione 200µl de etanol absoluto (96–100%) à solução e homogeneize imediatamente em *vortex* por 15 segundos (a formação de precipitado esbranquiçado nesta etapa é prevista). Centrifuge brevemente o microtubo para recolher o líquido da tampa.
 5. Transfira o volume total obtido na etapa 4 para a coluna de centrifugação *Spin Column CB3* (acoplada a um tubo de coleta de 2ml e centrifuge a 12.000rpm (13.400xg) por 30 segundos. Descarte o eluato (*flow-through*) e reintroduza a coluna no mesmo tubo de coleta.
 6. Adicione 500µl de Buffer GD (previamente suplementado com etanol absoluto) à coluna *Spin Column CB3*. Centrifuge a 12.000rpm (13.400xg) por 30 segundos, descarte o eluato e recolha a coluna no tubo de coleta.
 7. Adicione 600µl do Buffer PW (previamente suplementado com etanol absoluto) à coluna, centrifuge a 12.000 rpm (13.400xg) por 30 segundos. Descarte o eluato e recolha a coluna no tubo de coleta.
 8. Repita integralmente o procedimento descrito na etapa 7.
 9. Centrifuge o conjunto (*Spin Column CB3* e tubo de coleta) a 12.000rpm (13.400xg) por 2 minutos para remover os resíduos líquidos da membrana. Em seguida, mantenha a coluna aberta em temperatura ambiente (15–30°C) por 2 a 5 minutos para a evaporação completa do etanol residual.
- Nota:** Traços de etanol residual provenientes do *Buffer PW* são potentes inibidores enzimáticos e podem interferir negativamente em ensaios moleculares subsequentes (*downstream*), como PCR e restrição enzimática.
10. Transfira a coluna *Spin Column CB3* para um microtubo de 1,5ml estéril e livre de nucleases. Pipete de 50 µl do Buffer TE (ou água ultra pura, pH 7,0–8,5) diretamente no centro da membrana de sílica. Incube em temperatura ambiente por 2 a 5 minutos e centrifuge a 12.000rpm (13.400xg) por 2 minutos para eluir o DNA purificado.

Nota sobre a eficiência de recuperação e armazenamento:

- Visando otimizar o rendimento e a recuperação do DNA, o filtrado (eluato) contendo o material genético pode ser reintroduzido na coluna para uma nova etapa de adsorção. Incube em temperatura ambiente por 2 minutos e, em seguida, centrifuge a 12.000rpm (13.400xg) por 2 minutos.
- Volumes de eluição inferiores a 50µl reduzem substancialmente a eficiência de recuperação do gDNA. O rendimento da eluição é altamente dependente do pH da solução de escolha (recomenda-se a faixa alcalina de 7,0 a 8,5). Para a preservação da integridade do gDNA a longo prazo, recomenda-se a eluição em *Buffer TE* e armazenamento sob congelamento a -30°C, uma vez que o DNA mantido em água pura está suscetível à degradação por hidrólise ácida.

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