

BLOOD SPOTS DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-320

Armazenamento: ambiente

Descrição:

O BLOOD SPOTS DNA KIT emprega uma coluna de adsorção por centrifugação com afinidade específica para DNA, integrada a um sistema tampão exclusivo projetado para a extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue seco em papel-filtro (dried blood spots). A matriz de sílica utilizada na coluna consiste em uma matriz polimérica inovadora desenvolvida pela TIANGEN, a qual otimiza a eficiência e a especificidade do sepultamento de ácidos nucleicos, promovendo a eliminação substancial de proteínas contaminantes e de compostos orgânicos celulares. O DNA genômico isolado caracteriza-se por sua elevada integridade estrutural (alto peso molecular), alta pureza e reprodutibilidade analítica. O material genético purificado exibe compatibilidade com amplas aplicações moleculares downstream, incluindo digestão enzimática, PCR, qPCR (PCR quantitativo em tempo real), construção de bibliotecas para sequenciamento, Southern blot, entre outras metodologias analíticas.

Conteúdo do kit:

Componente	Volumes
Tampão de Lise	15ml
Tampão de Digestão	15ml
Tampão de Lavagem I	13ml
Tampão de Lavagem II	15ml
Tampão de Eluição	15ml
Proteinase K	1ml
Tubos de Coleta (2ml)	50 unid.
Colunas RNASE-Free	50 unid.
Tubos de Centrifuga (1,5ml)	50ml

Coleta, Armazenamento e Transporte de Amostras

1. **Coleta de Amostras:** As amostras de sangue total devem ser obtidas e imobilizadas em papel-filtro próprio para a técnica de sangue seco (*dried blood spots* – DBS), seguindo os protocolos padronizados de amostragem capilar ou venosa.
2. **Armazenamento:** O material biológico processado pode ser submetido imediatamente ao protocolo de extração ou armazenado sob selamento hermético e dessecação (umidade relativa < 30%), mantido entre 2 °C e 8 °C por um período de até 5 anos.
3. **Transporte:** Durante a cadeia de custódia e transporte, os cartões DBS devem permanecer hermeticamente vedados e condicionados em recipientes isotérmicos contendo gelo reutilizável ou matrizes de refrigeração para preservação da integridade dos ácidos nucleicos.

Considerações Metodológicas Relevantes

1. **Homogeneização de Reagentes:** Caso ocorra precipitação de sais nos Tampões de Lise ou Digestão, promova a solubilização completa do precipitado por incubação em banho-maria a 37 °C, seguida de agitação vigorosa em vórtice até a homogeneização total do sistema antes do uso.
2. **Estabilidade de Soluções:** Mantenha os frascos de reagentes perfeitamente vedados imediatamente após o manuseio para prevenir a evaporação e a variação da osmolaridade ou da concentração dos componentes.
3. **Condições de Centrifugação:** Todas as etapas de centrifugação do protocolo devem ser conduzidas à temperatura ambiente (15 °C a 25 °C).

Procedimento Experimental (Protocolo)

Preparo Prévio de Reagentes: Antes de iniciar o ensaio, adicione etanol anidro ou de alta pureza (96%–100%) aos Tampões de Lavagem I (17ml) e Lavagem II (60ml).

Amostragem: Transfira três discos de 3 × 3 mm da matriz de sangue seco (*dried blood spot* – DBS) para um microtubo de centrifugação de 1,5 mL livre de nucleases.

1. **Lise Primária:** Adicione 200 µL do Tampão de Lise ao microtubo contendo o material biológico.
2. **Digestão Proteolítica:** Adicione 20 µL de Proteinase K e homogeneize o sistema em agitador do tipo vórtice por 10 segundos. Incube a reação em termomixador previamente aquecido a 56 °C, sob agitação constante a 900 rpm, por 1 hora.
3. **Lise Térmica e Desnaturação:** Submeta o tubo a uma breve centrifugação (*pulse spin*). Adicione 200 µL do Tampão de Digestão e homogeneize em vortex por 10 segundos. Incube o tubo em a 70 °C, sob agitação a 900 rpm, por 10 minutos. Após a incubação, centrifugue brevemente para recolher as gotículas condensadas na tampa.

Nota: A adição do Tampão de Digestão pode induzir a formação de um precipitado esbranquiçado, o qual se redissolve durante a incubação a 70 °C, sem prejuízo às etapas subsequentes. A persistência de turbidez ao final da incubação indica lise celular incompleta, o que pode comprometer o rendimento e a pureza analítica do DNA.

4. Ajuste de Condições de Ligação: Adicione 100 µL de etanol (96%–100%) à mistura. Caso a temperatura ambiente seja superior a 25 °C, recomenda-se o pré-resfriamento do etanol em banho de gelo. Homogeneie suavemente por inversão, incube à temperatura ambiente por 5 minutos e realize uma breve centrifugação para recolher o precipitado de parede.
5. Adsorção do DNA à Matriz de Sílica: Transfira a totalidade do lisado para uma Coluna RNASE-FREE, previamente acoplada a um tubo coletor. Centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 30 segundos. Descarte o efluente do tubo coletor e reposicione a coluna no mesmo recipiente.
6. Lavagem Primária (Remoção de Impurezas): Adicione 500 µL do Tampão de Lavagem I (suplementado com etanol) à coluna RNASE-FREE. Centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 30 segundos. Descarte o efluente e acople novamente a coluna ao tubo coletor.
7. Lavagem Secundária (Dessalinização): Adicione 700 µL do Tampão de Lavagem II (suplementado com etanol) à coluna RNASE-FREE. Centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 30 segundos. Descarte o efluente e reposicione a coluna de centrifugação no tubo coletor.

Etapas Finais de Lavagem e Eluição do DNA

1. Segunda Lavagem (Dessalinização Adicional): Adicione 500 µL de Tampão de Lavagem II à RNASE-FREE e centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 30 segundos. Descarte o efluente do tubo coletor.
2. Secagem da Matriz de Sílica: Acople novamente a coluna RNASE-FREE ao tubo coletor e centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos para remover resíduos do tampão. Descarte o efluente e incube a coluna mantida à temperatura ambiente por 2 a 5 minutos para a evaporação completa do etanol residual na membrana de adsorção.

Nota: Esta etapa de secagem é crítica para eliminar traços de etanol residual da fase orgânica. A presença do solvente no eluato inibe reações enzimáticas *downstream* (e.g., digestão por enzimas de restrição, amplificação via PCR).

3. Eluição do DNA Genômico: Transfira a coluna RNASE-FREE para um microtubo de centrifugação de 1,5 mL esterilizado e livre de nucleases. Aplique de 20 a 50 µL de Tampão de Eluição diretamente no centro da membrana de adsorção. Incube à temperatura ambiente por 2 a 5 minutos para permitir a reidratação dos ácidos nucleicos. Centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos e recolha a solução purificada.

Notas Técnicas:

- Volume de Eluição: Recomenda-se um volume não inferior a 20 µL; volumes subótimos reduzem a eficiência de recuperação do material genético.
- Otimização do Rendimento: Para maximizar a recuperação de DNA genômico, o eluato obtido pode ser re-aplicado no centro da membrana RNASE-FREE, incubado à temperatura ambiente por 2 minutos e submetido a uma nova centrifugação a 12.000 rpm ($\sim 13.400 \times g$) por 2 minutos.
- Influência do pH na Eluição: O pH da solução de eluição é um parâmetro crítico para a dessorção do DNA da matriz de sílica. Se for utilizada água ultrapura (Milli-Q) como eluente, garanta que o pH esteja ajustado na faixa de 7,0 a 8,5 (utilizando NaOH, se necessário), pois valores de pH abaixo de 7,0 reduzem substancialmente a eficiência de eluição.
- Armazenamento: O DNA purificado deve ser conservado a -20 °C para prevenir a degradação enzimática ou hidrolítica a longo prazo.

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)