

NEXPUREZOL PLUS RNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-650

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 NEXPUREZOL PLUS RNA KIT é indicado para o isolamento de RNA total a partir de cultivos celulares e tecidos biológicos. Após a lise amostral com o reagente NexpureZol Plus e a adição de clorofórmio, a mistura se separa em três fases distintas: uma fase aquosa superior incolor (contendo o RNA), uma interfase e uma fase orgânica inferior de coloração rosa. Utiliza-se uma coluna de spin com matriz de sílica para a adsorção seletiva do RNA presente na fase aquosa. Em comparação a outros métodos de extração, o kit combina a elevada capacidade de lise, o rendimento superior e a versatilidade de aplicação do reagente TransZol Up com a alta pureza e eficiência propiciadas pela purificação em coluna de sílica.

Destaques de Desempenho:

- **Ampla Versatilidade de Aplicação:** Adequado para tecidos animais e vegetais, partículas virais, culturas bacterianas e outros espécimes. Compatível com microamostras (50–100 mg de tecido, 5×10^6 células ou 200 µL de sangue) até amostras de grande porte (2 g de tecido ou 2×10^7 células).
- **Alta Eficiência de Lise:** Lise celular rápida e completa, assegurando elevado rendimento de material genético.
- **Elevada Capacidade de Adsorção:** Capacidade máxima de ligação da coluna de sílica de até 100 µg de RNA.
- **Protocolo Rápido:** Processamento concluído em aproximadamente uma hora.
- **Separação de Fases Visualmente Distinta:** Fase orgânica pigmentada em rosa, facilitando a aspiração precisa da fase aquosa incolor sem arraste de contaminantes.
- **Elevada Pureza:** Redução máxima de contaminações residuais por DNA genômico e proteínas.

Componentes do kit

Componente	Volume
NexpureZol Plus	100ml
Tampão de Limpeza	110ml
Tampão de Lavagem	24ml
Água RNase-free	40ml
Tubos RNase-free	100 unid.
Colunas e Tubos de Coleta	100 unid.

Procedimentos Preliminares

Refrigere previamente a centrífuga entre 2 °C e 8 °C.

Adicione 96 mL de etanol absoluto ao Tampão de Lavagem antes do primeiro uso.

Reagentes fornecidos pelo usuário: clorofórmio e etanol absoluto.

1. Homogeneização e Lise Amostral

a. Células Aderentes

- Descarte o meio de cultura e lave a placa de cultivo uma vez com PBS 1x.
- Adicione 1 mL de NexpureZol Plus para cada 10 cm² de área de crescimento celular. Mantenha o frasco em posição horizontal por alguns instantes para assegurar a cobertura homogênea do tampão de lise sobre a monocamada celular.
- Desprenda as células por pipetagem suave (para linhagens de forte adesão, utilize um raspador celular).
- Transfira o lisado para um microtubo e homogeneie por aspiração/dispensação repetida até a dissolução completa de agregados visíveis.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos para a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos.

b. Bactérias e Células em Suspensão

- Transfira a suspensão celular ou bacteriana com o meio de cultura para um microtubo. Centrifuge a 8.000 × g por 2 minutos entre 2 °C e 8 °C e descarte o sobrenadante.
- Ressuspensão o pellet adicionando 1 mL de NexpureZol Plus para cada 10⁷ a 6 × 10⁷ células (ou equivalente bacteriano).
- Homogeneie por pipetagem até a completa ressuspensão do precipitado.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

c. Amostras Sanguíneas

- Adicione 1 mL de NexpureZol Plus para até 200 µL de sangue total (recomenda-se um volume mínimo de 50 µL de amostra).
- Homogeneie vigorosamente por pipetagem para garantir a lise completa dos leucócitos.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

d. Tecidos Animais e Vegetais

- Pese os espécimes ultracongelados e transfira-os rapidamente para um cadinho previamente resfriado com nitrogênio líquido. Triture o tecido vigorosamente até a obtenção de um pó homogêneo, adicionando nitrogênio líquido conforme necessário. A pulverização incompleta compromete diretamente o rendimento e a integridade do RNA.
- Transfira o tecido pulverizado para um microtubo. Adicione 1 mL de NexpureZol Plus para cada 50–100 mg de amostra. Homogeneie o tecido com o auxílio de um homogeneizador de tecidos ou por aspiração/dispensação repetida até a completa uniformização.
- Incube à temperatura ambiente por 5 minutos.

Separação de Fases e Purificação em Coluna

2. Separação de Fases: Adicione 0,2 mL de clorofórmio (ou 50 µL de 4-bromoanisol) para cada 1 mL de NexpureZol Plus utilizado. Agite o tubo vigorosamente em vortex por 30 segundos. Incube à temperatura ambiente por 3 minutos.

3. Centrifugação: Centrifuge a $10.000 \times g$ por 15 minutos entre 2 °C e 8 °C. O sistema bifásico se dividirá em uma fase orgânica inferior de coloração rosa, uma interfase proteica/gDNA e uma fase aquosa superior incolor contendo o RNA. O volume da fase aquosa corresponde a aproximadamente 50%–60% do volume inicial do reagente NexpureZol Plus.

4. Ajuste de Condições de Adsorção: Transfira cuidadosamente a fase aquosa incolor para um novo microtubo para evitar a contaminação por DNA genômico presente na interfase, recomenda-se deixar uma fração residual de fase aquosa sem aspirar. Adicione um volume equivalente de etanol absoluto (pode ocorrer a formação de precipitados visíveis nesta etapa). Homogeneie por inversão suave do tubo.

Todas as etapas de centrifugação subsequentes podem ser executadas à temperatura ambiente.

5. Ligação da Amostra: Transfira a mistura (solução e eventuais precipitados) para a coluna de spin de sílica. Centrifuge a $12.000 \times g$ por 30 segundos. Descarte o efluente (caso o volume total exceda a capacidade da coluna, repita esta etapa até que todo o volume seja processado).

6. Lavagem com Tampão de Limpeza: Adicione 500 µL do Tampão de Limpeza à coluna de spin. Centrifuge a $12.000 \times g$ por 30 segundos e descarte o efluente.

7. Segunda Lavagem (Tampão de Limpeza): Repita o procedimento da etapa 6.

8. Lavagem com Tampão de Lavagem: Adicione 500 µL do Tampão de Lavagem (certifique-se de que o etanol absoluto foi previamente adicionado ao frasco) à coluna de spin. Centrifuge a $12.000 \times g$ por 30 segundos e descarte o efluente.

9. Segunda Lavagem (Tampão de Lavagem): Repita o procedimento da etapa 8.

10. Secagem da Matriz: Centrifuge a coluna vazia a $12.000 \times g$ por 2 minutos para a remoção completa do etanol residual, prevenindo a inibição de reações subsequentes (como RT-qPCR).

11. Reidratação do RNA: Transfira a coluna de spin para um tubo de coleta livre de RNases (fornecido no kit). Aplique de 50 a 200 µL de água livre de RNases diretamente no centro da matriz de sílica e incube à temperatura ambiente por 1 minuto.

12. Eluição: Centrifuge a $12.000 \times g$ por 1 minuto para eluir o RNA purificado.

(Opcional: para maximizar a recuperação do material genético em amostras de alto rendimento, recomenda-se repetir as etapas 11 e 12 para uma segunda eluição).

13. Armazenamento: Conserve o RNA purificado em ultrafreezer a -80°C .

Observações Técnicas

- **Homogeneização:** A agitação vigorosa em vortex logo após a adição do clorofórmio é crucial para assegurar a partição eficiente entre as fases aquosa e orgânica.
- **Controle de RNases:** Garanta rigorosamente que todos os reagentes orgânicos (clorofórmio, etanol absoluto) e insumos (microtubos e ponteiras) sejam certificados como *RNase-free*.
- **Eficiência de Eluição:** Embora a coluna possua uma elevada capacidade de ligação (até 100 µg de RNA), o volume de água livre de RNases aplicado em uma única eluição pode ser limitante. Portanto, uma segunda etapa de eluição é recomendada para amostras com alta carga inicial.

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