MICRO GENOMIC DNA KIT

Por favor, leia o manual cuidadosamente antes de usar

Cat. No. XP-181

Armazenamento: RNA transportador a -18 °C ; os demais componentes , ambiente

Descrição:

O MICRO GENOMIC DNA KITutiliza o método de digestão enzimática para lisar amostras. O tampão de lise exclusivo deste kit pode lisar eficientemente pequenos volumes de células de uma variedade de materiais, incluindo sangue, manchas de sangue seco, soro/plasma, enxaguatório bucal, folículos pilosos, microtecidos, amostras microdissecadas e tecidos fixados em formaldeído. O DNA do lisado se ligará à coluna baseada em sílica e será eluído com o tampão de eluição. O DNA isolado é adequado para PCR, digestão por enzimas de restrição e outras aplicações subsequentes.

Conteúdo do kit:

Componente	Volumes
Tampão de Lise	6ml
Tampão de Ligação	28ml
Tampão de Limpeza	28ml
Tampão de Lavagem	12ml
Tampão de Eluição	5ml
RNA Transportador (1μg/μl)	55μl
Proteinase K (20mg/ml)	1ml
Colunas Spin e Tubos	50 unidades.

Quantidade requerida da Amostra

Tipo de Amostra	Quantidade
Cultura de Células	$1x10^4$-10^6 células
Tecidos	≤10mg
Tecidos em FFPE	≤10mg
E.coli	≤$1x10^9$ células
Sangue em anti-coagulante	1-50μl
Soro/Plasma	50-250μl
Swab	2-20ml
Spot seco de sangue	5mm^2-100mm^2
Foliculo capilas	1-20 unid.

Procedimentos

Instruções Prévias

Antes de iniciar, adicione 48 mL de etanol 100% ao frasco do Tampão de Lavagem.

Equilibre um banho-maria a 55 °C. Todas as etapas de centrifugação devem ser realizadas à temperatura ambiente.

1. Preparo do Material Biológico

Células em Cultura

- **(a) Células Aderentes:** Remova o meio de cultura da placa e colete as células por digestão com tripsina ou outro método de desprendimento celular. Centrifugue a $250 \times g$ por 5 minutos e descarte o sobrenadante.
- **(b) Células em Suspensão:** Colete as células por centrifugação a $250 \times g$ por 5 minutos e descarte o sobrenadante.
- **(c)** Adicione 100 µL de Tampão de Lise ao *pellet* celular e homogeneize completamente para restransferir/ressuspender as células.

(Opcional) Se a remoção de RNA for necessária, adicione 20 µL de RNase A à amostra e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

- **(d)** Adicione 20 µL de Proteinase K à amostra, homogeneize por agitação em vórtex e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

Tecidos, Amostras Microdissecadas, Amostras Fixadas em Formaldeído e Folículos capilar

- **(a)** Adicione ≤ 10 mg de tecido picado ou 1–20 fragmentos de folículo capilar (com 0,5 cm de comprimento a partir da base) em um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- **(b)** Adicione 100 µL de Tampão de Lise e 20 µL de Proteinase K ao tubo.
- **(c)** Incube a 55 °C até a lise completa da amostra (aproximadamente 3 horas para a maioria dos tecidos; amostras fixadas em formaldeído requerem lise *overnight*; cauda de camundongo requer cerca de 6–8 horas, podendo ser lisada *overnight* sob inversão suave 2–3 vezes por hora; a lise do folículo piloso leva cerca de 1 hora — a haste capilar remanescente não lisada não interfere nos ensaios subsequentes).

(Opcional) Se a remoção de RNA for necessária, adicione 20 µL de RNase A à amostra e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

- **(d)** Centrifugue à velocidade máxima (ex.: $12.000 \times g$) por 5 minutos e transfira cuidadosamente o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga estéril.

Bactérias

- **(a)** Adicione 50 µL a 1 mL de cultivo bacteriano ($DO_{600} = 1{,}0$) em um tubo de microcentrífuga. Centrifugue a $12.000 \times g$ por 1 minuto e descarte o sobrenadante.
- **(b)** Adicione 100 µL de Tampão de Lise e 20 µL de Proteinase K ao *pellet* celular. Homogeneize completamente para ressuspender as células.

(Opcional) Se a remoção de RNA for necessária, adicione 20 µL de RNase A à amostra e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

Sangue Anticoagulado

- **(a)** Transfira 6,5–50 µL de sangue anticoagulado para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- **(b)** Complete com Tampão de Lise até o volume final de 100 µL e adicione 20 µL de Proteinase K ao tubo. Homogeneize completamente por agitação em vórtex.

(Opcional) Para sangue anticoagulado fresco, caso a remoção de RNA seja necessária, adicione 20 µL de RNase A e incube à temperatura ambiente por 2 minutos (sangue congelado é isento de RNA funcional).

Soro / Plasma

- **(a)** Transfira 50–250 µL de soro/plasma para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- **(b) Opcional:** Se o volume de soro/plasma for inferior a 100 µL, ajuste para o volume final de 100 µL utilizando Tampão de Lise.
- **(c)** Adicione 20 µL de Proteinase K ao tubo e homogeneize vigorosamente em vórtex.

Swab

- **(a)** Transfira 2–20 mL de o liquido após o despeendimento do material do swab para um tubo cônico estéril de 50 mL. Centrifugue a $800 \times g$ por 5 minutos e descarte o sobrenadante.
- **(b)** Adicione 100 µL de Tampão de Lise para ressuspender o *pellet* e transfira todo o volume para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- **(c)** Adicione 20 µL de Proteinase K ao tubo, homogeneize em vórtex e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

(Opcional) Se a remoção de RNA for necessária, adicione 20 µL de RNase A e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

Manchas de Sangue Seco (*Dried Blood Spots*)

- **(a)** Recorte uma área de 5 mm^2 a 100 mm^2 da mancha de sangue seco em pequenos fragmentos e transfira para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
- **(b)** Adicione 100 µL de Tampão de Lise e 20 µL de Proteinase K ao tubo, homogeneize em vórtex e incube à temperatura ambiente por 2 minutos.

2. Protocolo de Extração e Purificação

1. **Adição do Tampão de Lise/Ligação:** Adicione 500 µL de Tampão de Ligação e 1 µL de RNA Transportador. Homogeneize vigorosamente por agitação em vórtex e incube em banho-maria a 55 °C por 10 minutos. Homogeneize em vórtex três vezes ao longo da incubação.
2. **Adsorção da Amostra:** Aplique todo o volume da mistura na coluna de rotação (*spin column*). Centrifugue a $12.000 \times g$ por 30 segundos e descarte o efluente (*flow-through*).

3. **Primeira Lavagem:** Adicione 500 µL de Tampão de Limpeza, centrifugue a $12.000 \times g$ por 30 segundos e descarte o efluente.
4. **Segunda Lavagem:** Adicione 500 µL de Tampão de Lavagem (certifique-se de que o etanol foi adicionado previamente), centrifugue a $12.000 \times g$ por 30 segundos e descarte o efluente.
5. **Repetição da Lavagem:** Repita a etapa 4 mais uma vez.
6. **Secagem da Membrana:** Centrifugue a $12.000 \times g$ por 2 minutos para remover completamente os resíduos de Tampão de Lavagem.
7. **Eluição Primária:** Transfira a coluna de rotação para um tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 mL. Adicione 30–100 µL de Tampão de Eluição (pré-aquecido a 65 °C) ou água destilada estéril (pH $> 7{,}0$) diretamente no centro da membrana. Incube à temperatura ambiente por 1 minuto. Centrifugue a $12.000 \times g$ por 1 minuto para eluir o DNA purificado.
8. **Eluição Secundária (Opcional):** Para otimizar o rendimento de DNA, realize uma segunda eluição. Aplique 30–100 µL do Tampão de Eluição (pré-aquecido a 65 °C) ou água destilada estéril (pH $> 7{,}0$) no centro da membrana. Incube à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugue a $12.000 \times g$ por 1 minuto.

Armazene o DNA purificado a -20 °C.

Notas Técnicas

1. **Maceramento de Tecidos:** Pique o tecido o máximo possível para assegurar uma lise eficiente.
2. **Integridade do Material:** Para garantir alta qualidade e integridade do DNA genômico, utilize amostras frescas e evite ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. A qualidade do DNA obtido varia em função da matriz biológica, das condições e do tempo de armazenamento.
3. **Estratégia de Eluição:** Na segunda eluição, recomenda-se utilizar o próprio eluído da primeira etapa ou um volume menor de tampão para evitar a diluição excessiva da amostra.
4. **Amostras de Baixa Concentração (Microamostras):** Amostras biológicas como soro, plasma ou traços teciduais fornecem rendimentos reduzidos de DNA. Portanto, o DNA extraído dessas matrizes não é recomendado para análise direta por eletroforese em gel de agarose ou quantificação por espectrofotometria (ex.: NanoDrop); priorize métodos mais sensíveis como qPCR ou fluorimetria (ex.: Qubit).

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