

Uso exclusivo em pesquisa.

## Kit de Extração de DNA Genômico Sangue, Células e Tecido

Catálogo	Especificação	Armazenamento
CV-D007-50	50T	Temperatura ambiente/ 1 ano
CV-D007-200	200T	Temperatura ambiente/ 1 ano

### Introdução

O kit é adequado para extrair DNA total de alta pureza de tecidos animais frescos ou congelados, células, sangue, bactérias e outras amostras. Fragmentos de DNA com peso molecular máximo de 50 KB podem ser purificados sem o uso de solventes tóxicos como fenol, clorofórmio e precipitação com etanol. O sistema de tampão otimizado é usado para ligar eficientemente e especificamente o DNA da solução de pirólise à coluna de adsorção centrífuga à base de sílica. Inibidores de PCR e outras reações enzimáticas podem ser efetivamente removidos por etapas de lavagem em dois passos. Finalmente, DNA de alta pureza pode ser obtido usando tampão de baixo teor de sal ou eluição com água. O DNA purificado pode ser diretamente utilizado em digestão enzimática, PCR, PCR em tempo real, construção de bibliotecas, Southern Blot, marcadores moleculares e outros experimentos downstream.

### Componentes do Kit

Componente	CV-D007-50	CV-D007-200	Armazenamento
Proteinase K	1 ml	4 ml	-20°C
Solução GA1	15 ml	60 ml	Temperatura Ambiente
Solução GS	15 ml	60 ml	Temperatura Ambiente
Solução GA2	25 ml	100 ml	Temperatura Ambiente
Tampão de Lavagem	30 ml	120 ml	Temperatura Ambiente
Solução RP	60 ml	240 ml	Temperatura Ambiente
Solução GE	15 ml	60 ml	Temperatura Ambiente
Coluna de Adsorção G	50 conjuntos	200 conjuntos	Temperatura Ambiente
Manual do Usuário	1 cópia	1 cópia	Temperatura Ambiente

## Uso exclusivo em pesquisa.

### Antes de começar

**Tampão de Lavagem e Solução RP:** Adicione uma quantidade apropriada de etanol absoluto ao Tampão de Lavagem e Solução RP (indicado no rótulo da garrafa de reagente) antes do uso.

### Atenção

1. As amostras devem evitar congelamentos e descongelamentos repetidos, caso contrário, os fragmentos de DNA extraídos serão menores e a quantidade de extração diminuirá.
2. Se estiver extraíndo o genoma de uma cultura bacteriana com grande acumulação de metabólitos secundários ou espessura da parede celular, é recomendável coletar as amostras no início da fase de crescimento logarítmico.
3. Adicione etanol absoluto ao Buffer de Lavagem e Solução RP conforme descrito no rótulo da garrafa de reagente antes do primeiro uso.
4. Antes de usar, verifique se a Solução GA1, Solução GS, e Solução GA2 cristalizaram ou precipitaram. Se houver cristalização ou precipitação, dissolva a Solução GA1, Solução GS e Solução GA2 em banho-maria a 37°C.
5. Se os experimentos subsequentes forem sensíveis à contaminação por RNA, adicione 20µL de RNase A livre de DNase (20 mg/ml) antes de adicionar a Solução GA2. A RNase A não está incluída neste kit e pode ser encomendada separadamente da empresa, se necessário.

### Passos Operacionais

#### 1. Processamento da Amostra

a. Ao extrair 200µL de amostra de sangue, adicione a amostra ao tubo de centrifugação (auto-preparado) e prossiga diretamente para o próximo experimento. Nota: Para manusear volumes maiores de sangue, como 300 µL a 1 mL, siga estes passos: adicione 3 volumes de lisado de células vermelhas ao sangue (por exemplo, adicione 300 µL de sangue a 900 µL de lisado de células vermelhas), misture por inversão, deixe em temperatura ambiente por 5 minutos, inverta e misture várias vezes. Centrifugue a 10000 rpm (~11.500 × g) por 1 minuto (se a velocidade máxima da centrifugadora não permitir, centrifugue a 3000 rpm (~3.400×g) por 5 minutos), aspire o sobrenadante, deixando o pellet de leucócitos, adicione 200 µL de Solução GA1, agite até misturar completamente; quando o volume da amostra de sangue for inferior a 200µL, adicione Solução GA1 para completar 200µL.

b. Se a amostra de sangue a ser processada for sangue anticoagulado de aves, aves, anfíbios ou organismos inferiores, os glóbulos vermelhos são células nucleadas, e o volume da amostra de sangue for de 5-20 µL, Solução GA1 pode ser adicionada para completar até 200 µL para experimentos subsequentes.

c. Ao extrair uma amostra de ( $2 \times 10^7$  células), colete as células por centrifugação e ressuspenda as células com 200  $\mu$ L de Solução GA1 para prosseguir para o próximo passo.

d. Quando a amostra for tratada como tecido animal, adicione rapidamente 200 $\mu$ L de Solução GA1 após a moagem completa no nitrogênio líquido e, após ressuspendê-la suficientemente (pode ser adequadamente moída), o próximo passo pode ser realizado.

e. Quando a amostra for tratada com 1-30 mL de bactérias, adicione a amostra ao tubo de centrifugação (auto-preparado), centrifugue, colete o precipitado e ressuspenda com 200 $\mu$ L de Solução GA1. Nota: Se os experimentos subsequentes forem sensíveis ao RNA, adicione 4  $\mu$ L de solução de RNase A (100 mg/ml), agite por 15 segundos e deixe à temperatura ambiente por 2 minutos.

2. Adicione 20 $\mu$ L de Proteinase K à solução acima e misture bem.
3. Adicione 200 $\mu$ L de Solução GS, adicione a amostra tratada, misture agitando suavemente e centrifugue levemente para remover o líquido residual aderido à parede do tubo. Banhe em água a 56°C por 10 minutos. Se for difícil digerir amostras como tecido, considere um tempo de digestão de 1-3 horas ou até digestão durante a noite. Nota: Após a digestão ser concluída, a solução no tubo deve estar clara e transparente. Se não estiver clara e transparente, é recomendado estender o tempo de tratamento até a transparência. Ou absorva cuidadosamente a parte superior da solução transparente após centrifugação, mas haverá mais perda de DNA.
4. (Opcional) Se a digestão no passo anterior não estiver completa, pode causar obstrução da coluna de adsorção nas operações subsequentes. Neste passo, centrifugue a 12.000 rpm a 4°C ( $\approx 13.400 \times g$ ) por 1 minuto, pipete cuidadosamente o sobrenadante em um tubo EP limpo e prossiga para o próximo passo.
5. Centrifugue brevemente para remover gotículas de água da parede interna da tampa. Adicione 350 $\mu$ L de GA2 e misture bem por vortex. Adicione 350 $\mu$ L de etanol absoluto. Agite completamente e centrifugue brevemente (apenas agite para remover as gotículas de água na parede do tubo). Nota: 1). Misture imediatamente após adicionar Solução GA2. 2). Após a adição de Solução GA2, podem ser produzidos precipitados brancos, que não afetarão os experimentos subsequentes. Algumas organizações podem formar um produto tipo sol após a adição de Solução GA2. Neste momento, é recomendado realizar uma vibração violenta ou tratamento por vortex.
6. Adicione a mistura obtida no passo anterior à coluna de adsorção fornecida pelo kit (se não puder ser adicionada de uma vez, pode ser adicionada várias vezes) centrifugue a 12.000 rpm ( $\approx 13.400 \times g$ ) por 1 minuto, despeje o tubo de coleta. Líquido de resíduo. Coloque a coluna de adsorção de volta no tubo de coleta.
7. Adicione 500 $\mu$ L de Solução RP à coluna de adsorção (verifique se o etanol foi adicionado antes do uso). Centrifugue a 12.000 rpm por 1 minuto, despeje o líquido de resíduo do tubo de coleta e coloque a coluna de adsorção de volta no tubo de coleta. Nota: Para melhorar ainda mais a pureza do DNA, repita o passo 7.

8. Adicione 600µL de Buffer de Lavagem à coluna de adsorção (verifique se o etanol foi adicionado antes do uso). Centrifugue a 12.000 rpm por 1 minuto. Despeje o líquido de resíduo do tubo de coleta e coloque a coluna de adsorção de volta no tubo de coleta.
9. Centrifugue a 12.000 rpm por 2 minutos e drene o resíduo do tubo de coleta. Permita que a coluna fique em temperatura ambiente por alguns minutos para secar completamente. Nota: O objetivo deste passo é remover o etanol residual na coluna de adsorção, e o etanol residual afetará a reação enzimática subsequente (digestão enzimática, PCR, etc.).
10. Coloque a coluna de adsorção em um novo tubo de centrifuga (preparado pelo usuário), adicione 50-200 µL de Solução GE ou água esterilizada no meio da coluna de adsorção, deixe à temperatura ambiente por 2-5 minutos, centrifugue a 12.000 rpm por 1 minuto e colete o DNA e a solução. Armazene o DNA a -20 °C.

**Nota:**

1. Se os experimentos subsequentes forem sensíveis ao pH ou EDTA, pode ser eluído com água esterilizada. O valor de pH do eluente tem grande influência na eficiência da eluição. Se o eluente for água, o pH deve estar entre 7,0 e 8,5 (o pH da água pode ser ajustado para essa faixa com NaOH). Quando o pH for inferior a 7,0, o tempo de eluição não é eficiente.
2. A Solução GE é pré-aquecida em banho-maria a 65-70 °C. A incubação à temperatura ambiente por 5 minutos antes da centrifugação pode aumentar o rendimento; a re-eluição com um adicional de 50-200 µL de Solução GE ou água esterilizada pode aumentar o rendimento.
3. Se desejar aumentar a concentração final de DNA, você pode re-adicionar a solução obtida à coluna de adsorção, deixar à temperatura ambiente por 2-5 minutos, centrifugar a 12.000 rpm por 1 minuto; se o volume de eluição for inferior a 200 µL, aumente a concentração final de DNA, mas isso pode reduzir a produção total. Se a quantidade de DNA for inferior a 1 µg, é recomendado eluir com 50 µL de Solução GE ou água esterilizada.
4. Porque o DNA armazenado em água é afetado pela hidrólise ácida, se o armazenamento a longo prazo for necessário, é recomendado usar Solução GE para eluir e armazenar a -20 °C.

**Detecção de concentração e pureza do DNA:** O tamanho dos fragmentos de DNA genômico obtido está relacionado a fatores como tempo de armazenamento da amostra e força de cisalhamento durante a operação. Os fragmentos de DNA recuperados podem ser detectados quanto à concentração e pureza por eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria ultravioleta. O DNA deve apresentar um pico de absorção significativo em OD260, com um valor de OD260 de 1 equivalente a aproximadamente 50 µg/mL de DNA de fita dupla e 40 µg/mL de DNA de fita simples. A razão de OD260/OD280 deve ser de 1,7 a 1,9. Se o tampão de eluição não for utilizado durante a eluição, e for utilizada água

deionizada, a razão será menor devido ao pH e à presença de íons, mas isso não significa que a pureza seja baixa.

**Atenção:**

1. As amostras devem ser protegidas de congelamento e descongelamento repetidos, caso contrário, os fragmentos de DNA extraídos serão menores e a quantidade de extração será reduzida.
2. Se houver precipitado na Solução GA1, Solução GS ou Solução GA2, redissolva em banho-maria a 56 °C, agite e use.
3. Todos os passos de centrifugação são realizados usando uma centrífuga de bancada e centrifugados à temperatura ambiente.

**Perguntas Frequentes**

A. Coluna bloqueada

Sugestão: Por favor, lise bem a amostra, sem floculação óbvia, e prossiga para o próximo passo; lave com Solução RP várias vezes (note que múltiplas lavagens resultarão em baixa recuperação genômica); utilize filtro de agulha descartável ou filtro de tela de 200 poços.

B. Baixa taxa de extração genômica

Sugestão: Aumente o tempo de digestão, aumente o tamanho da amostra, etc.

C. Precipitado na solução não está dissolvido

Sugestão: A solução irá precipitar quando a temperatura estiver baixa. Por favor, verifique se há precipitado antes de usar. Se houver precipitação, incube a 37 °C por um tempo até que a solução esteja esclarecida.

D. Solução de lavagem não foi adicionada ao etanol conforme necessário

Sugestão: A Solução de lavagem não adiciona a quantidade necessária de etanol de acordo com as instruções. Adicione a quantidade necessária de etanol absoluto, aperte bem a tampa após o uso para evitar volatilização do etanol.

E. Seleção de volume e tempo para dissolução

Sugestão: O volume dissolvido afetará o rendimento final, quanto maior o volume dissolvido, maior o rendimento, mas a concentração será reduzida. Por favor, utilize o volume recomendado de dissolução no kit para garantir o melhor rendimento e concentração. Após adicionar o Tampão de Eluição, 2-5 minutos à temperatura ambiente são mais favoráveis para a dissolução.