

Uso exclusivo para pesquisa.

Kit de Extração de DNA de Sangue Total Mini Prep

Número do Catálogo	Especificação	Armazenamento/Validade
CV-D008-50	50T	Temperatura ambiente/1 ano
CV-D008-200	200T	Temperatura ambiente/1 ano

Introdução

Este produto pode separar e purificar rapidamente o DNA genômico de 200-400 µl de sangue total fresco ou congelado de humanos ou animais dentro de 15-20 minutos. O produto não utiliza proteinase K. Após o sangue total ser dissolvido pela Solução BFL1, a hemoglobina é removida pela precipitação com a Solução BFL2. O DNA genômico no sobrenadante pode ser ligado à coluna de purificação. Após ser lavado com o Tampão RP e Tampão de Lavagem, as proteínas restantes na membrana e os inibidores de PCR são removidos, e o DNA genômico é eluído pelo Tampão de Eluição, podendo ser usado imediatamente em vários experimentos de biologia molecular.

Componentes do Kit

Componente	CV-D008-50	CV-D008-200	Armazenamento
Solução BFL1	20ml	80ml	Temperatura ambiente
Solução BFL2	20ml	80ml	Temperatura ambiente
Tampão RP	30ml	120ml	Temperatura ambiente
Tampão de Lavagem	60ml	240ml	Temperatura ambiente
Tampão de Eluição	10ml	40ml	Temperatura ambiente
Coluna de Adsorção G	50 sets	200 sets	Temperatura ambiente
Manual do usuário	1 cópia	1 cópia	Temperatura ambiente

Uso exclusivo para pesquisa.

Antes de começar

Adicione etanol absoluto ao Tampão RP e ao Tampão de Lavagem conforme indicado no rótulo do frasco de reagente e marque o rótulo no círculo do rótulo.

Nota:

1. Este procedimento é projetado para extrair DNA de 400 µl de sangue total. Se o volume de sangue for menor que 400 µl, mas maior que 200 µl, a quantidade de Solução BFL1 e Solução BFL2 pode ser reduzida proporcionalmente (observe que a Solução BFL1 deve ser rigorosamente seguida: sangue total anticoagulado: Solução BFL2 = operação em proporção volumétrica de 3:4:3, caso contrário, levará à impossibilidade de realizar a próxima etapa). Os outros reagentes não mudam; se o volume de sangue for inferior a 200 µl, recomenda-se suplementar o sangue com solução salina fisiológica para fazer o volume de sangue atingir pelo menos 200 µl.
2. Sangue com alto teor de gordura e sangue de aves podem não ser aplicáveis.

Etapas de Operação

1. Adicione 300 µl de Solução BFL1 a um tubo de centrífuga de 1,5 ml. Adicione 400 µl de sangue total anticoagulado, feche o tubo e vórtice por 30 segundos.
 - Nota: Não adicione menos que 400 µl de volume de sangue total anticoagulado. Se o volume de sangue for menor que 400 µl, adicione solução salina normal para fazer o volume de sangue atingir 400 µl.
2. Adicione 300 µl de Solução BFL2, agite o tubo vigorosamente 3-5 vezes e vórtice por 30 segundos.
 - Nota: Esta etapa resultará na precipitação de uma grande quantidade de hemoglobina.
3. Centrifugue a 12.000 rpm (~13.000×g) por 2 minutos à temperatura ambiente. Se necessário, centrifugue por mais tempo.
4. Cuidadosamente aspire o sobrenadante da etapa 3 na coluna de adsorção G. Não absorva o sedimento inferior para evitar bloquear a coluna de adsorção e causar falha na extração! Feche o tubo e centrifugue a 12.000 rpm (~13.000×g) por 60 segundos à temperatura ambiente.
 - Nota: O volume do sobrenadante obtido pela centrifugação pode ser maior que o da coluna purificada devido à pequena quantidade de hemoglobina no sangue de alguns animais. Neste caso, recomenda-se aspirar 700 µl do sobrenadante para a coluna de adsorção G, ou limpar o sobrenadante. Realize a operação desta etapa duas vezes.
5. Descarte o filtrado, coloque a coluna de adsorção G de volta no tubo de coleta, adicione 500 µl de Tampão RP na coluna de adsorção G (verifique se há adição de

etanol absoluto antes do uso), feche o tubo, centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.000\times g$) por 60 segundos.

- Nota: Se houver hemoglobina na membrana da coluna purificada, é normal e pode ser lavada com Tampão RP. Repita esta etapa se necessário.
6. Descarte o filtrado, coloque a coluna de adsorção G de volta no tubo de coleta, adicione 600 μl de Tampão de Lavagem na coluna de adsorção G (verifique se há adição de etanol absoluto antes do uso), feche o tubo, centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.000\times g$) por 30 segundos.
 7. Repita a etapa 6.
 8. Descarte o filtrado, coloque a coluna de purificação de volta no tubo de coleta, e centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.000\times g$) por 2 minutos à temperatura ambiente.
 9. Transfira a coluna de adsorção G para um tubo de centrifuga limpo, adicione 50-100 μl de Tampão de Eluição ao meio da membrana de adsorção, deixe à temperatura ambiente por 2-5 minutos, centrifugue a 12.000 rpm ($\sim 13.400\times g$) por 1 minuto. Coleta a solução no tubo de centrifuga.
 - Nota: Para aumentar o rendimento de DNA genômico, a solução centrifugada pode ser adicionada à coluna de adsorção G, deixada à temperatura ambiente por 2 minutos, e centrifugada a 12.000 rpm ($\sim 13.400\times g$) por 2 minutos. O volume do Tampão de Eluição não deve ser inferior a 100 μl , e o volume muito pequeno pode afetar a recuperação. O pH do Tampão de Eluição tem grande influência na eficiência de eluição. Se a água for usada como Tampão de Eluição, o pH deve estar na faixa de 7,0-8,5 (o pH da água pode ser ajustado para esta faixa com NaOH). Se o pH for inferior a 7,0, a eficiência de eluição será reduzida; e o produto de DNA deve ser armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar a degradação do DNA.

Deteção de Concentração e Pureza do DNA

O tamanho do fragmento de DNA genômico obtido está relacionado a fatores como o tempo de armazenamento da amostra e a força de cisalhamento durante a operação. Os fragmentos de DNA recuperados podem ser detectados para concentração e pureza por eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria ultravioleta. O DNA deve ter um pico de absorção significativo em OD260, com um valor OD260 de 1 equivalente a aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de fita dupla e 40 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de fita simples. A razão OD260/OD280 deve ser de 1,7-1,9. Se o Tampão de Eluição não for usado na eluição e a água deionizada for usada, a razão será mais baixa porque o valor de pH e a presença de íons afetarão o valor de absorção de luz, mas isso não significa que a pureza seja baixa.

Atenção

1. As amostras devem ser protegidas contra congelamento e descongelamento repetidos, caso contrário, os fragmentos de DNA extraídos serão menores e a quantidade de extração será reduzida.

2. Se houver um precipitado na Solução BFL1 ou Solução BFL2, redissolva em um banho-maria a 56 °C, agite e use.
3. Todas as etapas de centrifugação são realizadas usando uma centrífuga de bancada e centrifugadas à temperatura ambiente.

Perguntas Frequentes e Respostas

1. A concentração de genoma ou genoma foi baixa

- **Coluna bloqueada:**
 - Sugestão: Tente usar amostras de sangue fresco. Múltiplas lavagens com a Solução RP (múltiplas lavagens resultarão em baixa recuperação genômica). Algumas amostras congeladas podem ter hemólise e estagnação, e o tempo de centrifugação pode ser aumentado para 10 minutos na quarta etapa.
- **Taxa de extração de genoma baixa:**
 - Sugestão: Não há muitos genomas em 200 µl de sangue. É normal a baixa concentração de corrida de gel. Se a demanda subsequente for grande, pode ser extraída e concentrada após múltiplas extrações.
- **Precipitado na solução não dissolvido:**
 - Sugestão: A solução precipitará quando a temperatura estiver baixa. Verifique se há algum precipitado antes do uso. Se houver precipitação, incube a 37 °C por um tempo, até que a solução esteja clara.
- **A Solução de Lavagem não foi adicionada ao etanol conforme necessário:**
 - Sugestão: Adicione a quantidade necessária de etanol absoluto à Solução de Lavagem de acordo com as instruções. Aperte a tampa do frasco após o uso para evitar a volatilização do etanol.
- **Seleção do volume e tempo para dissolução:**
 - Sugestão: O volume de dissolução afetará o rendimento final. Quanto maior o volume de dissolução, maior o rendimento, mas a concentração será reduzida. Use o volume recomendado de dissolução no kit para garantir o melhor rendimento e concentração. Após adicionar Tampão de Eluição, deixe de 2 a 5 minutos à temperatura ambiente para favorecer a dissolução.

Uso exclusivo para pesquisa.