

Para uso exclusivo em pesquisa.

Kit de Extração de DNA Genômico do Solo

No. Catálogo	Especificação	Armazenamento/Validade
CV-D022-50	50T	Temperatura ambiente/1 ano
CV-D022-50	200T	Temperatura ambiente/1 ano

Introdução

Este produto é adequado para a extração de DNA total de 180~220 mg de solo fresco ou congelado. O DNA genômico de plantas ou animais, DNA viral, DNA bacteriano e parasitário no solo pode ser combinado com a coluna de purificação de ácido nucleico após dissolução. Proteínas degradadas e inibidores de PCR são filtrados. Após a lavagem do DNA genômico com solução de lavagem TL e RP, a eluição com Tampão TE pode ser utilizada em vários experimentos de biologia molecular.

Componentes do Kit

Componente	CV-D022-50	CV-D022-200	Armazenamento
Solução SGE	80 ml	160 ml*2	Temperatura ambiente
Solução InR	15 ml	60 ml	Temperatura ambiente
Solução GA2	12 ml	48 ml	Temperatura ambiente
Tampão de Lavagem	70 ml	280 ml	Temperatura ambiente
Solução RP	25 ml	100 ml	Temperatura ambiente
Tampão de Eluição	10 ml	40 ml	Temperatura ambiente
Protease K	525 µl	2.1 ml	-20°C
Coluna de Adsorção G	50 conjuntos	200 conjuntos	Temperatura ambiente
Manual do Usuário	1 cópia	1 cópia	Temperatura ambiente

Para uso exclusivo em pesquisa.

I. Preparação antes do uso

- Se a centrífuga tiver função de refrigeração, ajuste a temperatura para 25°C. Todas as operações de centrifugação neste experimento são realizadas a 25°C.
- Ajuste a temperatura do banho-maria para 70°C e 95°C, e incube os Tampões SGE e de Eluição a 70°C.
- De acordo com as instruções no rótulo da garrafa de reagente, adicione etanol absoluto aos Tampões WA e WB e marque a caixa do rótulo como "álcool adicionado".

Procedimentos Operacionais

1. Pese 180~220 mg de solo sólido com um tubo de centrífuga de 2 ml fornecido; se a solução de solo for líquida, absorva diretamente 200 μ l da solução de solo.

Nota: Se o conteúdo do genoma extraído do solo for baixo, você pode concentrar uma maior quantidade de solução de lavagem do solo e tomar 200 μ l para experimentos subsequentes para melhorar o rendimento de DNA.

2. Adicione 1,4 ml de Tampão SGE e feche a tampa do tubo. Vórtex até que o solo esteja totalmente disperso e não haja grandes partículas. Banho-maria a 95°C por 5 minutos.
Nota: Se você apenas precisa detectar o DNA de bactérias Gram-negativas no solo, um banho-maria a 70°C por 5 minutos é suficiente.
3. Centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente.
4. Pipete cerca de 1,2 ml do sobrenadante do passo anterior em um novo tubo EP, adicione 1/5 do volume de Solução InR (vibre e misture bem antes de usar), agite bem e deixe em repouso por 1 minuto.
5. Centrifugue a 12000 rpm por 3 minutos e transfira o sobrenadante para um novo tubo EP.
6. Repita o passo 5 uma vez.
7. Pipete 200 μ l do sobrenadante da centrifugação do passo 6 em um novo tubo de centrífuga de 1,5 ml.
8. Pipete 10 μ l da solução estoque de Proteinase K e misture por pipetagem.
9. Adicione 200 μ l de Solução GA2 e vórtex por cerca de 15 segundos para misturar. Coloque o tubo de centrífuga em um banho-maria a 70°C por 10 minutos.
10. Adicione 200 μ l de etanol absoluto e inverta gentilmente 4-6 vezes para misturar uniformemente. Centrifugue em baixa velocidade por alguns segundos para permitir que a solução na tampa do tubo se assente no fundo do tubo.
11. Adicione a mistura obtida no passo anterior à coluna de adsorção G fornecida neste kit (se não puder adicionar de uma vez, pode adicionar em várias vezes), centrifugue a 12000 rpm ($\approx 13,400\times g$) por 1 minuto e descarte o tubo de coleta. Coloque a coluna de adsorção de volta no tubo de coleta.

12. Adicione 500 µL de Solução RP à coluna de adsorção (verifique se o etanol absoluto foi adicionado antes do uso), centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto, descarte o líquido residual no tubo de coleta e coloque a coluna de adsorção de volta no tubo de coleta.
13. Adicione 700 µL de Tampão de Lavagem à coluna de adsorção (verifique se o etanol absoluto foi adicionado antes do uso), centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto, descarte o líquido residual no tubo de coleta e coloque a coluna de adsorção de volta no tubo de coleta. *Nota:* Se for necessário melhorar ainda mais a pureza do DNA, repita o passo 13.
14. Centrifugue a 14000 rpm por 2 minutos e descarte o líquido residual no tubo de coleta. Deixe a coluna à temperatura ambiente por alguns minutos para secar completamente. *Nota:* O objetivo deste passo é remover o etanol residual na coluna de adsorção. O etanol residual afetará as reações enzimáticas subsequentes (digestão enzimática, PCR, etc.).
15. Coloque a coluna de adsorção em um novo tubo de centrifuga (fornecido por você), adicione 50-200 µL de Tampão de Eluição ou água estéril no meio da coluna de adsorção, deixe à temperatura ambiente por 2-5 minutos e centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto. Coleta a solução de DNA e armazene o DNA a -20°C. *Nota:* 1) Se o experimento subsequente for sensível ao pH ou EDTA, pode ser eluído com água estéril. O valor de pH do eluente tem grande influência na eficiência de eluição. Se a água for usada como eluente, o pH deve ser de 7,0-8,5 (o valor de pH da água pode ser ajustado para esta faixa com NaOH), e o valor de pH abaixo de 7,0 não resultará em uma eficiência de eluição alta. 2) O Tampão de Eluição é pré-aquecido em banho-maria a 65-70°C. Incube à temperatura ambiente por 5 minutos antes da centrifugação para aumentar o rendimento; a eluição com outros 50-200 µL de Tampão de Eluição ou água estéril pode aumentar o rendimento. 3) Se você deseja aumentar a concentração final de DNA, pode adicionar a solução obtida à coluna de adsorção, deixar à temperatura ambiente por 2-5 minutos e centrifugar a 12000 rpm por 1 minuto; se o volume de eluição for inferior a 200 µL, pode aumentar a concentração final de DNA, mas pode reduzir o rendimento total. Se a quantidade de DNA for inferior a 1 µg, é recomendável eluir com 50 µL de Tampão de Eluição ou água estéril. 4) Porque o DNA armazenado em água será afetado pela hidrólise ácida, se o armazenamento em longo prazo for necessário, é recomendável eluir com Tampão de Eluição e armazenar a -20°C.

Precauções:

- As amostras de solo recém-coletadas devem ser armazenadas a -20°C ou inferior em tempo hábil. Mesmo que o solo seja deixado à temperatura ambiente por 2-3 horas, será observada degradação do DNA extraído; se for deixado por um tempo mais longo, o DNA extraído pode ser degradado muito seriamente, e até mesmo não será observada nenhuma banda de DNA visível por eletroforese.

Para uso exclusivo em pesquisa.