

Instruções de Uso.
Kit de purificação de
produto da PCR e DNA
em banda de Gel de
agarose.

ÍNDICE

| | |
|--|---|
| ÍNDICE | 2 |
| 1- Finalidade do Kit | 3 |
| 2- Princípio de ação | 3 |
| 3- Apresentação Comercial | 3 |
| 4- Equipamentos e Insumos | 3 |
| 5- Reagentes Contidos no Kit: | 4 |
| 6- Insumos Contidos no Kit: | 4 |
| 7- Materiais necessários, não fornecidos no Kit: | 4 |
| 8- Condições de Armazenamento e Transporte | 4 |
| 9- Amostras | 4 |
| 10- Cuidados Especiais | 4 |
| 11- Medidas de Segurança | 5 |
| 12- Protocolo – Procedimento para purificação de produto da PCR (amplicon) | 5 |
| 13- Protocolo – Procedimento para purificação de DNA em banda de gel de agarose | 7 |
| 14- Limitações | 8 |
| 15- Referência bibliográfica | 8 |
| 16- Atendimento ao consumidor | 8 |
| 17- Simbologia Utilizada nos Rótulos | 9 |

1- Finalidade do Kit

Esse Kit foi desenvolvido para a purificação de amplicons, DNA genômico ou mitocondrial separados por eletroforese em gel de agarose. De acordo com a necessidade, é possível cortar especificamente uma ou mais bandas do gel e realizar a purificação. O resultado é a banda desejada livre de outros fragmentos de DNA, incluindo primers. Os ácidos nucleicos obtidos podem ser utilizados para variadas aplicações como PCR, qPCR, e sequenciamento.

2- Princípio de ação

Com o **Kit de purificação de produto da PCR e DNA em banda de Gel de agarose** é possível purificar produtos da PCR (amplicons) eliminando, durante o processo de lavagem, os primers/iniciadores e DNTp não utilizados na síntese do DNA alvo, além de recuperar e purificar o DNA a partir de bandas de gel de agarose (0,5 a 2%). Após o contato com a solução de lise, a agarose se desfaz e os ácidos nucleicos ficam livres na solução para se ligarem à coluna de sílica.

A Solução de Lise e a adição de Etanol criam condições apropriadas para a ligação de ácidos nucleicos à resina do Kit *pht*. Contaminações e possíveis inibidores da reação de PCR como sais, metabólitos e substâncias solúveis, como componentes celulares macromoleculares, são facilmente removidos nas duas etapas de lavagem com as soluções A e B. A eluição realizada com tampão contendo baixa concentração de sais, mantém o DNA pronto para uso em reações subsequentes.

OBS: respeite os volumes indicados. Excesso de material na amostra pode prejudicar o processo de purificação, consulte nosso setor técnico para maiores esclarecimentos.

3- Apresentação Comercial

- Kit de extração para 50 extrações; (K3-50)
- Kit de extração para 100 extrações; (K3-100)
- Kit de extração para 250 extrações; (K3-250)

4- Equipamentos e Insumos

O **Kit de purificação de produto da PCR e DNA em banda de Gel de agarose** é composto por:

| Reagentes/Insumos | Quantidade por Kit | | |
|--------------------------|--------------------|---------------|---------------|
| | 50 extrações | 100 extrações | 250 extrações |
| KO.1K3 - Solução de Lise | 01 frasco | 02 frascos | 01 frasco |
| K0.2- Etanol | 01 frasco | 02 frascos | 01 frasco |
| K0.3 - Solução A | 01 frasco | 02 frascos | 01 frasco |
| K0.4 - Solução B | 01 frasco | 02 frascos | 01 frasco |
| K0.5 - Tampão de eluição | 02 frascos | 02 frascos | 01 frasco |
| K0.7 - Tubo de lise | 50 unid | 100 unid | 250 unid |

5- Reagentes Contidos no Kit:

- K0.1K3: Solução de Lise – Guanidina com solução tampão e detergente;
- K0.2: Etanol – Álcool etílico 95%;
- K0.3: Solução A – Guanidina com solução tampão;
- K0.4: Solução B – Solução tampão;
- K0.5: Tampão de eluição – Solução tampão;

6- Insumos Contidos no Kit:

- K0.7: Tubo de lise - Tubo polipropileno;

7- Materiais necessários, não fornecidos no Kit:

- Micropipetas e ponteiras estéreis com filtro (0,5-10µL, 10-100µL, 100-1000µL);
- Capela de fluxo laminar;
- Microtubo 2ml ou 1,5 ml com tampa para eluir o DNA da coluna;
- Microcentrífuga;
- Agitador Vórtex;
- Banho Maria;
- Equipamento de Proteção Individual (máscara; luvas; óculos; etc).

8- Condições de Armazenamento e Transporte

Todos os produtos podem ser transportados em temperatura ambiente de 15°C a 30°C ±5°C. A temperatura de armazenamento é de 15°C a 25°C ±5°C. Manter ao abrigo da luz e umidade.

9- Amostras

Produtos da PCR e Fragmentos de DNA em gel de agarose.

10- Cuidados Especiais

Antes de utilizar o produto, leia as instruções de uso;

PRODUTO DE USO ÚNICO. PROIBIDO REUTILIZAR;

Não aceitar o recebimento do produto quando ele estiver com embalagens e/ou lacres de segurança danificados;

A manipulação de qualquer etapa desse Kit deve ser realizada por especialistas devidamente treinados;

O desempenho do Kit está diretamente relacionado aos equipamentos e instrumentos utilizados e necessitam estar devidamente calibrados e em boas condições de uso;

O nível de segurança para manipulação de qualquer amostra alvo, deve ser diretamente relacionado ao seu nível de periculosidade;

O descarte de qualquer material biológico ou químico utilizado durante a manipulação, deve ser feito conforme o procedimento de gerenciamento de resíduos da instituição;

Não utilizar o kit fora da data de validade;

Cuidado ao manusear amostras biológicas para evitar contaminação das soluções do Kit;

Não congele os reagentes do kit

Evite ao máximo o congelamento/descongelamento das amostras;

Para obtenção de informações referentes à biossegurança e ações em casos de acidentes com o produto, consultar a FISPQ (Ficha de Segurança de Produto Químico)

disponíveis no SAC (Serviço de Assistência ao Cliente) da Phoneutria Biotecnologia e Serviços através do e-mail **pht@phoneutria.com.br** ou pelo telefone **+55 31 99585-3050** ou **+55 31 3427-6413**.

11- Medidas de Segurança

Atenção! Para a manipulação do **Kit de purificação de produto da PCR e DNA em banda de Gel de agarose** será necessário o uso de todos os EPI's (não fornecidos pelo kit): jaleco, luvas de procedimento, máscaras N95 ou cirúrgicas, óculos de proteção, avental de mangas longas;

Ao realizar a manipulação **de amostras**, recomenda-se utilizar todos os EPI's (não fornecidos pelo kit): jaleco, luvas de procedimento, máscaras N95 ou cirúrgicas, óculos de proteção, avental de mangas longas;

Para a manipulação do gel no transiluminador, use um protetor facial que barre com eficiência a luz UV.

Os reagentes que compõem o **Kit de purificação de produto da PCR e DNA em banda de Gel de agarose** contêm as seguintes características:

Inflamáveis; perigosos se ingeridos; irritante aos olhos, sistema respiratório e pele; pode causar sensibilização por inalação; vapores podem causar enjoos e tonturas. Evite contato com a pele e mucosas; manusear os reagentes longe de fontes de ignição; em casos de acidentes, procure cuidados médicos imediatamente;

12-Protocolo – Procedimento para purificação de produto da PCR (amplicon)

Após a realização da PCR siga diretamente para a purificação do amplicon; caso seja necessário armazene o material alvo (amplicon) à 4°C para um período de tempo de 1 a 3 horas e à -20°C para um período de tempo maior. Evite ficar congelando e descongelando o material, isso pode degradar o produto da PCR.

1- Identificar os tubos de lise. Adicionar de **10 a 50 µl de amostra** (produto da PCR) em cada tubo de lise.

2- A **Solução de Lise** possui um precipitado (resina) de cor branca. Esse material faz parte da composição da **Solução de Lise** e é insolúvel. Homogeneíze a **Solução de Lise** com movimentos rotatórios. Repita o processo caso necessário, ou seja, se você observar a resina depositada no fundo do frasco da solução de lise durante o uso.

3- Adicionar ao tubo de lise, **400 µl de Solução de Lise**. Misturar no vórtex (velocidade máxima) por 3 segundos e incube por 30 segundos a temperatura ambiente.

4- Adicionar **250 µl de Álcool etílico 95%**. Homogeneizar no vórtex (velocidade máxima) por 3 segundos.

5- Centrifugue por 2 minutos a 6.000 g.

- 6- Retire o sobrenadante com auxílio de uma pipeta.
 - 7- Adicionar **350 µl de Solução A**. Ressuspender o pelete formado e centrifugar por **2 minutos a 6.000 g**.
 - 8- Retire o sobrenadante com auxílio de uma pipeta.
 - 9- Adicionar **400 µl de Solução B**. Ressuspender o pelete formado e centrifugar por **2 minutos a 6.000 g**.
 - 10- Retire o sobrenadante com auxílio de uma pipeta.
 - 11- Incubar a Temperatura Ambiente (T.A) por 30-60 min, ou 20 minutos a 60°C, com a tampa do tubo de lise aberta.
 - 12- Ressuspender completamente o pelete com **25 a 50 µl de Tampão de Eluição** livre de RNase/DNase.
- OBS:** caso você adicione um volume maior que o utilizado no item 1 você estará diluindo a sua amostra ao final do protocolo.
- 13- Incubar à T.A. por 3 min (tampa da coluna fechada).
 - 14- Centrifugar por 2 minutos a 10.000 g, mantendo a tampa da coluna fechada. O DNA está presente no sobrenadante.
 - 15- Transferir o sobrenadante para um novo tubo (não fornecido pelo kit). O DNA está presente no sobrenadante.
 - 16- Usar ou estocar o DNA purificado. Geladeira ou gelo para uso imediato, -20°C para uso posterior. A precipitação dos ácidos nucleicos é uma opção para conservar amostras por tempo prolongado. Use a solução de precipitação de ácidos nucleicos da PHT (não disponível nesse kit).

13-Protocolo – Procedimento para purificação de DNA em banda de gel de agarose

Após realizar a eletroforese com tampão de corrida (TAE ou TBE) visualize a banda de DNA desejada no transiluminador UV. Com um estilete corte a banda desejada. Retire a maior quantidade possível de agarose sem DNA, deixando somente a parte do gel com o DNA alvo. A quantidade máxima de gel recomendada para uma extração é de 250 mg. Quantidades maiores irão reduzir a ligação do DNA na resina. Antes de iniciar o processo, retire o excesso de tampão de corrida (TAE ou TBE) da banda de agarose cortada do seu gel. Lembre-se de usar um protetor facial para barrar a luz UV do transiluminador. A banda de DNA retirada do gel pode ser congelada e utilizada posteriormente no processo de purificação. Bandas de DNA em agarose congelada podem liberar tampão de corrida. Não descarte esse tampão liberado. Ele deve ser usado no processo de purificação do DNA em gel de agarose.

- 1- Ligue o banho Maria e ajuste a temperatura para 60°C.
 - 2- Faça a eletroforese do seu DNA alvo em gel de agarose. Evite concentrações acima de 2% de agarose. Utilize como tampão de corrida TAE (1X) ou TBE (0,5 – 1x).
 - 3- Corte a banda desejada com auxílio de um estilete. Elimine o máximo possível de agarose sem DNA.
 - 4- A quantidade máxima recomendada para uma extração é de 250 mg de agarose com a banda de DNA alvo. Para quantidades maiores, faça duas ou mais extrações independentes.
 - 5- Após identificar o tubo de lise, introduza o fragmento de agarose com DNA dentro do tubo.
- OBS:** Nesse ponto, você pode congelar sua amostra e realizar o processo posteriormente. Congele sua amostra preferencialmente no tubo de lise. prossiga o processo seguindo os passos abaixo.
- 6- A **Solução de Lise** possui um precipitado (resina) de cor branca. Esse material faz parte da composição da **Solução de Lise** e é insolúvel. Homogeneíze a **Solução de Lise** com movimentos rotatórios. Repita o processo caso necessário, ou seja, se você observar a resina depositada no fundo do frasco da solução de lise durante o uso.
 - 7- Adicionar ao tubo de lise, **400 µl de Solução de Lise**. Certifique-se de que toda a agarose esteja submersa na solução de lise.
 - 8- Incubar o tubo de lise com a amostra a 60°C de 15 a 20 minutos (Ou até a completa dissolução da agarose).
 - 9- Homogeneizar no vórtex (velocidade máxima) por 3 segundos.
 - 10- Adicionar **250 µl de Álcool etílico 95%**. Homogeneizar no vórtex (velocidade máxima) por 3 segundos.

- 11- Centrifugue por 2 minutos a 6.000 g.
- 12- Retire o sobrenadante com auxílio de uma pipeta.
- 13- Adicionar **350 µl de Solução A**. Ressuspender o pelete formado e centrifugar por **2 minutos a 6.000 g**.
- 14- Retire o sobrenadante com auxílio de uma pipeta.
- 15- Adicionar **400 µl de Solução B**. Ressuspender o pelete formado e centrifugar por **2 minutos a 6.000 g**.
- 16- Retire o sobrenadante com auxílio de uma pipeta.
- 17- Incubar à Temperatura Ambiente (T.A) por 30-60 min com a tampa aberta. Ou 20 minutos à 60°C com a tampa do tubo de lise aberta.
- 18- Ressuspender completamente o pelete com **25 a 50 µl de Tampão de Eluição** livre de RNase/DNase.
- 19- Incubar à T.A. por 3 min (tampa da coluna fechada).
- 20- Centrifugar por 2 minutos a 10.000 g, mantendo a tampa da coluna fechada. O DNA está presente no sobrenadante.
- 21- Transferir o sobrenadante para um novo tubo (não fornecido pelo kit). O DNA está presente no sobrenadante.
- 22- Usar ou estocar o DNA purificado. Geladeira ou gelo para uso imediato, -20°C para uso posterior. A precipitação dos ácidos nucleicos é uma opção para conservar amostras por tempo prolongado. Use a solução de precipitação de ácidos nucleicos da PHT (não disponível nesse kit).

14- Limitações

Temperaturas de armazenamento do kit abaixo da recomendada pode precipitar componentes da solução de lise. No caso de formação de precipitado, deve-se incubar a solução em banho-maria à 40°C-50°C até a completa solubilização do precipitado. O não cumprimento dos cuidados especiais para correta manipulação das amostras podem invalidar resultados.

15-Referência bibliográfica

Sambrook, Joseph. Russell, David William. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

16-Atendimento ao consumidor

SAC (Serviço de Assistência ao Cliente) da Phoneutria Biotechnologia e Serviços através do e-mail **pht@phoneutria.com.br** ou pelo telefone **+55 31 99585-3050** ou **+55 31 3427-6413**.

Horário de atendimento: Segunda-feira a Sexta-feira: 08h às 17h

17-Simbologia Utilizada nos Rótulos

| | | | | | |
|---|---|---|--|---|--------------------|
|  | Não reutilizar |  | Cuidado |  | Fabricante |
|  | Consultar as instruções para utilização |  | Manter em local seco |  | Data de Fabricação |
|  | Manter afastado de luz solar Manter longe do calor |  | Não utilizar se a embalagem estiver danificada |  | Data de Validade |
| REF | Número de Catálogo |  | Não armazenar acima de 30°C | LOT | Nº de lote |
| IVD | Produto de Diagnostico In Vitro |  | Risco Biológico |  | Inflamável |
|  | Corrosivo |  | Tóxico |  | Perigo |



Phoneutria Biotechnologia e Serviços LTDA

CNPJ: 00.353.885/0001-02

Endereço: Rua Teles de Menezes, 148 - Santa Branca
Belo Horizonte – Minas Gerais – CEP: 31565-130