

Uso exclusivo para pesquisa.

KIT de Extração de DNA Genômico de Fezes

No. Catálogo	Especificação	Armazenamento/Validade
CV-D012-50	50T	Temperatura ambiente/1 ano
CV-D012-200	200T	Temperatura ambiente/1 ano

Introdução Este kit é adequado para separar DNA total de 180 a 220 mg de fezes humanas ou animais frescas ou congeladas. O DNA genômico, DNA viral, DNA bacteriano e parasitário do humano ou animal nas fezes dissolvidas pode ser ligado à coluna de purificação de ácido nucleico, e a proteína degradada e o inibidor de PCR são removidos por filtração, e o DNA genômico é lavado por Tampão de Lavagem e Solução RP. Após a lavagem, pode ser utilizado em vários experimentos de biologia molecular, eluindo com Tampão de Eluição.

Componentes do Kit

Componente	CV-D012-50	CV-D012-200	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
Proteinase K	525 µl	2.1 ml	-20°C
Coluna de Adsorção G	50 unidades	200 unidades	Temperatura ambiente
Manual do Usuário	1 cópia	1 cópia	Temperatura ambiente

Uso exclusivo para pesquisa.

Antes de começar

1. Se a centrífuga tiver função de resfriamento, ajuste a temperatura para 25°C. Toda a centrifugação neste experimento é realizada a 25°C.
2. A temperatura do banho-maria foi ajustada para 70°C e 95°C, e os Tampões SGE e Eluição Tampão foram incubados a 70°C.
3. Adicione etanol absoluto ao Tampão de Lavagem e Solução RP de acordo com as instruções no rótulo da garrafa de reagente e marque a caixa para indicar "etanol adicionado".

Passos Operacionais

1. Pese 180~220 mg de fezes sólidas com um tubo de centrífuga de 2 ml autocontido; se as fezes estiverem em estado líquido, colete 200 µl de fezes diretamente.
2. Adicione 1,4 ml de Tampão SGE e cubra o tubo. Agite vigorosamente até as fezes estarem completamente dispersas e sem grandes partículas. Banho-maria a 95°C por 5 minutos. Nota: Se você precisar detectar apenas DNA de células intestinais ou bactérias Gram-negativas nas fezes, utilize banho-maria a 70°C por 5 minutos.
3. Centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente.
4. Pipete aproximadamente 1,2 ml de sobrenadante do passo anterior para um novo tubo EP, adicione 1/5 do volume de Solução InR (agite e misture completamente antes do uso), misture bem e agite, deixe em repouso por 1 minuto.
5. Centrifugue a 12000 rpm por 3 minutos e aspire o sobrenadante para um novo tubo EP.
6. Repita o passo 5 uma vez.
7. Pipete 200 µl do sobrenadante de centrifugação do passo 6 em um novo tubo de centrífuga de 1,5 ml.
8. Pipete 10 µl da solução estoque de Proteinase K e misture por pipetagem.
9. Adicione 200 µl de Tampão GA2 e agite vigorosamente por cerca de 15 segundos para misturar. O tubo foi colocado em banho-maria a 70°C por 10 minutos.
10. Adicione 200 µl de etanol absoluto e misture suavemente 4 a 6 vezes para misturar uniformemente. Centrifugue em baixa velocidade por alguns segundos para permitir que a solução na tampa se assente no fundo do tubo.
11. 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 em várias vezes), centrifugue a 12000 rpm ($\approx 13,400 \times g$) por 1 minuto, descartando o líquido de resíduos no tubo de coleta e recolocando a coluna de adsorção no tubo de coleta.
12. Adicione 500 µL de Solução RP à coluna (verifique se o etanol absoluto foi adicionado antes do uso), centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto, drene o líquido de resíduos do tubo de coleta e recoloque a coluna no tubo de coleta.

13. Adicione 700 µL de Tampão de Lavagem à coluna (verifique se foi adicionado etanol absoluto antes do uso), centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto, drene o líquido de resíduos do tubo de coleta e recoloca a coluna no tubo de coleta. Nota: O passo 13 pode ser repetido para aumentar ainda mais a pureza do DNA.
14. Centrifugue a 12000 rpm por 2 minutos e drene o líquido de resíduos do tubo de coleta. Deixe a coluna secar completamente à temperatura ambiente por alguns minutos. Nota: O objetivo deste passo é remover o etanol residual da coluna de adsorção. O etanol residual afetará a reação enzimática subsequente (digestão enzimática, PCR, etc.).
15. Coloque a coluna de adsorção em um novo tubo de centrífuga (fornecido pelo usuário), adicione 50-200 µL de Tampão de Eluição ou água esterilizada no meio da coluna de adsorção, deixe à temperatura ambiente por 2-5 minutos e centrifugue a 12000 rpm por 1 minuto. Coletando a solução de DNA e armazenando a -20°C. Nota: 1) Se o teste subsequente for sensível ao pH ou EDTA, ele pode ser eluído com água esterilizada. O valor de pH do eluente tem uma grande influência na eficiência de eluição. Se o eluente for usado como água, o pH deve ser de 7,0-8,5 (o pH da água pode ser ajustado para esta faixa com NaOH), e se o pH for inferior a 7,0, a eficiência de eluição não será alta.
2. O Tampão de Eluição é pré-aquecido 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 50-200 µL adicionais de Tampão de Eluição ou água esterilizada pode aumentar o rendimento.
3. Se a concentração final de DNA precisar ser aumentada, a solução obtida pode ser adicionada à coluna de adsorção, deixada à temperatura ambiente por 2-5 minutos, centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto; se o volume de eluição for inferior a 200 µL, a concentração final de DNA pode ser aumentada, mas pode reduzir a produção total. Se a quantidade de DNA for inferior a 1 µg, é recomendável eluir com 50 µL de Solução GE ou água esterilizada.
4. Porque o DNA armazenado em água é afetado pela hidrólise ácida, se precisar ser armazenado por um longo tempo, é recomendável usar Solução GE para eluir e armazenar a -20°C.

Atenção Amostras fecais recém-coletadas devem ser armazenadas a -20°C ou abaixo a tempo. Mesmo se as fezes (fezes humanas) forem armazenadas à temperatura ambiente por 2-3 horas, fenômenos de degradação podem ser observados após a extração de DNA; se deixadas por mais tempo, a degradação do DNA pode ser muito séria, e até mesmo as bandas de DNA visíveis na eletroforese podem não ser observadas.

Uso exclusivo para pesquisa.