

ECRA MAG+ SOLIDUS

Kit para extração de ácidos nucleicos (DNA/RNA) p/ amostras sólidas

Quantidade 250 extrações; Produto personalizado destinado a teste



Validade 6 meses após a abertura ou o máximo de acordo com o COA.

Temperatura de transporte: ambiente.

Temperatura de armazenamento: ambiente.

Descrição do produto

O kit para extração de ácidos nucleicos **ECRA MAG+ SOLIDUS** contém os componentes necessários para a extração de ácidos nucleicos de amostras sólidas, como microorganismos de parede celular rígida, tecidos humanos, solo e plantas (pós lise mecânica). Esse kit tem como diferencial a utilização de nanopartículas de ferrosilicadas (*beads*) magnetizadas para mediar a extração dos ácidos nucleicos [1]. Quando apenas o DNA é necessário, a lise da amostra sólida é primeiramente mediada pela digestão enzimática em tampão TNES (Detergentes) com a Proteinase K e RNase A, removendo proteínas e RNA da amostra. Após esta primeira incubação, em sequência é adicionado o tampão de lise, desnaturando as proteínas associadas ao DNA e atividades enzimáticas da etapa anterior. Por fim, a amostra clarificada entra na etapa de ligação com as *beads* em meio alcoólico para precipitação e ligação dos ácidos nucleicos nas nano esferas seguida pela etapa final de eluição do DNA em água ultrapura. Toda a operação pode ser feita em temperatura ambiente.

Diretrizes para o uso da ECRA MAG+

Tabela 1. Reagentes fornecidos

Componente	Volume (mL)	Cor
Tampão TNES	15	Branco
Tampão de ressuspensão	1,375	Branco
Proteinase K	0,550*	Branco
RNase	0,825*	Branco
Tampão de lise	30	Roxo
Beads magnéticas	30	Vermelho
Solução de ligação	160	Amarelo
Solução de lavagem	150	Verde
H ₂ O	12,5	Azul

*Após adição do tampão de ressuspensão.

Antes de começar:

1. Adicione respectivamente 550 μ L e 825 μ L do tampão de ressuspensão nos tubos da proteinase K e RNase. Após a adição do tampão, armazene estes tubos a -20 C e evite longas exposições a temperatura ambiente.
2. Tenha ao seu alcance micropipetas, ponteiros com filtro, micro tubos de 1,5 ml, incubador de temperatura a e RACK 16P ECRA MAG+.

Diretrizes para extração de ácidos nucleicos

Etapa de lise:

1. Colete **20mg** de sua amostra sólida. Quanto menor as partículas amostra, maior o rendimento final.

OBS: Etapas de maceração, congelamento e desnaturações diversas podem auxiliar nesta etapa.

2. Adicione 60 μ L de Tampão TNES na amostra.
3. Adicionar e homogeneizar vigorosamente, na seguinte ordem, os componentes em um microtubo de 1,5 mL livre de nucleases:
 - a. 3 μ L de RNase (para extração de ácidos nucleicos totais não adicione este item).
 - b. 2 μ L de Proteinase K
4. Incubar a 55 °C por 60 minutos.

OBS: Incubações podem ser estendidas para maiores rendimentos (4h ou overnight com ou sem agitação).

5. (Opcional): Centrifugue o tubo e recupere apenas o sobrenadante da amostra para a etapa seguinte em um novo tubo. **Em amostras de solo essa etapa é fundamental.**
6. Adicione 120 μ L do tampão de lise e homogeneíze por inversão (10x) e aguarde 5 minutos.

Etapa de ligação e lavagem:

7. Adicione 440 μ L da solução de ligação, homogeneíze por inversão (10x) e aguarde 5 minutos.
8. Adicione 120 μ L de *beads*, homogeneíze por inversão (10x) e aguarde 1 minutos.

9. Posicionar o microtubo em um rack magnético (produto não fornecido) e incube por 10 min. A amostra deve estar na mesma altura dos ímãs da rack.
 10. Com o microtubo ainda no rack magnético, com o auxílio de uma micropipeta, descarte todo o sobrenadante e debrís celulares, evitando contato com as *beads*.
 11. Com o microtubo no ainda rack magnético, adicionar 240 µL de solução de ligação e incube por 30 s.
 12. Com o microtubo ainda no rack magnético, com o auxílio de uma micropipeta, descarte o sobrenadante, evitando contato com as *beads*.
 13. Com o microtubo ainda no rack magnético, adicione 300 µL de solução de lavagem e incube 30 s.
 14. Com o microtubo ainda no rack magnético, com o auxílio de uma micropipeta, descarte o sobrenadante, evitando contato com as *beads*.
 15. Repita os passos 13 e 14.
 16. Com o microtubo ainda no rack magnético, aguarde por 3-5 min a evaporação dos líquidos residuais.
- OBS: Não esperar muito tempo após a evaporação, pois as *beads* aderem entre si, perdendo rendimento na etapa posterior.

Etapas de eluição:

17. Remova o microtubo do rack magnético e adicione 55 µL de H₂O. Homogeneíze com o auxílio de uma micropipeta e incube por 10 min.
18. Posicione o microtubo no rack magnético e incube por 5 minutos, ou até a separação completa das *beads*.
19. Transfira 50 µL do líquido para um novo microtubo. Utilizar o conteúdo imediatamente ou congelar o conteúdo a -80°C até o momento de utilização, visando manter a estabilidade do ácido nucleico.

Resolução de problemas

- Em caso de baixo rendimento da extração, pode ser realizado os seguintes procedimentos:
 - a. Realizar uma etapa de lise celular específica à célula de origem; i.e: bloco térmico, maceração com nitrogênio líquido

e/ou sonicação;

- b. Aumentar a concentração celular inicial;
 - c. Aumentar o tempo de eluição (etapa 19) para até 30 min;
 - d. Proteinase K, RNase, DTT e/ou β-mercaptoetanol podem ser adicionados à amostra para aumentar o rendimento da extração.
- Caso a solução de beads perca da atividade magnética (má qualidade do DNA 260/280 <1.5) com a aparecimento de uma cor marrom claro:
 - a. Isso indica a contaminação das *beads* com agente oxidante. Para resolução deste problema, adicione todo o conteúdo das beads em um tubo e coloque-o na rack magnética incubando por 10 min ou até as beads se segregarem totalmente; em seguida remova toda a água turva da solução e adicione o mesmo volume de água com padrão biologia molecular.

Precauções

Tiocianato de guanidínio (CASNr 593-84-0) é nocivo por ingestão e pode causar irritações. Em caso de acidentes, lavar cuidadosamente após o manuseio. O descarte do produto deverá ser realizado de acordo com a legislação local.

Especificações

Tampão de lise: Isotiocianato de guanidina 6 M; Tris-HCl 50 mM; N-Dodecanoyl-N-methylglycine 68 mM; EDTA 20 mM; pH 8,0.

H₂O: a água fornecida pela *ECRA Biotec* é tratada para eliminação de nucleases.

Armazenamento e uso

Armazene todos os componentes em temperatura ambiente com excessão da proteinase K e RNase A. Caso haja precipitado no tampão de lise, homogeneize até a completa solubilização dos componentes. Caso necessário, aqueça a 60 °C por 5 minutos e deixe esfriar lentamente;

Controle de qualidade

Este produto passou pelos seguintes ensaios de controle de qualidade: validação da extração

em diferentes células, verificado em eletroforese de ácidos nucleicos.

Referências

[1] Sun N, Deng C, Liu Y, Zhao X, Tang Y, Liu R, Xia Q, Yan W, Ge G. Optimization of influencing factors of nucleic acid adsorption onto silica-coated magnetic particles: application to viral nucleic acid extraction from serum. *J Chromatogr A*, 2014, 1325: 31–39.

Garantia

A *ECRA Biotec* garante que seus produtos atendem às especificações indicadas na seção de dados técnicos. Os produtos serão substituídos gratuitamente se não estiverem conforme as especificações. Essa substituição deve ser realizada no prazo de 60 dias após o seu recebimento. Em consideração aos compromissos acima referidos pela *ECRA Biotec*, o comprador concorda e aceita as seguintes condições:

- Esta garantia substitui todas as outras, sejam expressas ou implícitas;
- O único recurso do comprador será para obter a substituição do produto de forma gratuita.

Uso para a pesquisa

Estes produtos se destinam a fins de pesquisa por pessoas qualificadas.

Aviso aos usuários:

É de responsabilidade do usuário utilizar os produtos da *ECRA Biotec* para determinar por si próprio a adequação de qualquer material e/ou procedimento para uma finalidade específica e que adote as precauções de segurança que possam ser necessárias.

Kit **ECRA MAG+ SOLIDUS** é uma marca comercial da *ECRA Biotec*

Versão 1 (Mar/2023)

ECRA Biotec Serviços e Pesquisas LTDA. | Contato: sic@ecrabiotec.com | Tel.: (11) 91365-1996
Estr. Giuseppina Vianelli Di Napolli, 1455, Conj W8, Campinas - SP 13086-530