

# prepiT®•L2P

## Manual de protocolo de purificação manual

**DNAgenotek**



[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

Tel.: +1.613.723.5757  
[support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)  
[sales@dnagenotek.com](mailto:sales@dnagenotek.com)

3000 - 500 Palladium Drive  
Ottawa, ON, Canadá K2V 1C2

*Amostras superiores  
Desempenho comprovado*



Visite nosso site em **www.dnagenotek.com** para obter uma versão em página inteira de cada protocolo e quaisquer idiomas adicionais.

**O suporte técnico está disponível de segunda a sexta-feira (9h00 às 17h00 ET):**

- Ligação gratuita (América do Norte): 1-866-813-6354, opção 6
- Todos os outros países: +1 (613) 723-5757, opção 6
- E-mail: [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com)

O Oragene®•DNA e ORAcollect®•DNA não estão disponíveis para venda nos Estados Unidos. O Oragene®•DISCOVER é destinado apenas a uso em pesquisa, não a uso em procedimentos de diagnóstico.

O ORAcollect®•Dx foi liberado para uso diagnóstico in vitro nos EUA.

Alguns produtos DNA Genotek podem não estar disponíveis em todas as regiões geográficas.

®Oragene, prepIT e ORAcollect são marcas registradas da DNA Genotek Inc.

Todas as outras marcas e nomes aqui contidos são de propriedade de seus respectivos proprietários.

Todos os protocolos, white papers e notas de aplicação da DNA Genotek estão disponíveis na seção de suporte do nosso site, em [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com).

Representante Autorizado Europeu

Emergo Europe

Prinsessegracht 20, 2514 AP The Hague, The Netherlands

ANVISA Registro MS: 80117580845

Importador: Emergo Brazil Import Importação e Distribuição de Produtos Médicos Hospitalares LTDA.

Endereço: Avenida Francisco Matarazzo, 1.752, salas 502/503, Água Branca, São Paulo, SP - CEP: 05001-200/CNPJ: 04.967.408/0001-98.

E-mail: [brazilvigilance@ul.com](mailto:brazilvigilance@ul.com)

Responsável Técnico: Luiz Levy Cruz Martins - CRF-SP: 42415

Patente ([www.dnagenotek.com/legalnotices](http://www.dnagenotek.com/legalnotices))

## Índice

Uso previsto.....	5
Resumo e explicação de uso.....	5
Características .....	5
Materiais.....	5
Cuidados e precauções.....	5
Limitações de uso do produto .....	5
Transporte do prepIT•L2P .....	6
Armazenamento do prepIT•L2P (Prazo de validade).....	6
Eliminação .....	6
Manutenção/reparos .....	6
Características de desempenho.....	6
Informações sobre patentes.....	6
Garantias .....	7
Solução de problemas .....	7

## protocolo de laboratório prepIT®

para purificação manual de DNA a partir de 0,5 mL de amostra .....	Página 9
para purificação manual de DNA de toda a amostra .....	Página 13
para purificação manual de DNA de 0,5 mL usando uma placa profunda de 96 poços.....	Página 21
Quantificação de DNA .....	Página 26



## Uso previsto

Para a purificação do DNA genômico dos produtos Oragene®, kits de coleta OCD-100, OCR-100 e OC-175. Não destinado a uso com OCD-100A.

## Resumo e explicação de uso

Veja o protocolo nas páginas 9-25.

## Características

- Química otimizada para recuperação máxima de DNA de amostras orais coletadas com as linhas de produtos Oragene e ORAcollect.
- Comprovado para fornecer resultados consistentes com DNA de alto peso molecular.
- Método de purificação escalável para volumes de amostra grandes ou pequenos.
- Fluxo de trabalho conveniente, com suporte técnico completo, desde a coleta até a extração.
- Método econômico que requer um equipamento mínimo.

## Materiais

- prepIT•L2P (PT-L2P-1.5, prepIT-L2P-5 e/ou prepIT-L2P-45)
- manual do produto prepIT•L2P

## Cuidados e precauções

- Apenas para uso em laboratório.
- NÃO ingerir o reagente líquido.
- NÃO use se a embalagem estiver danificada ou se a tampa do funil estiver quebrada ou vazando.
- NÃO use o prepIT•L2P além da data de validade indicada no frasco do reagente.
- Lave com água se o reagente entrar em contato com os olhos ou a pele.
- A Ficha de Dados de Segurança do Material (MSDS) está disponível em: [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)

## Limitações de uso do produto

Use o prepIT•L2P apenas conforme indicado neste manual do produto.

## Transporte do prepIT•L2P

O prepIT•L2P pode ser transportado à temperatura de 15 a 30 °C como reagente de laboratório. Nenhum manuseio especial é necessário.

## Armazenamento do prepIT•L2P (Prazo de validade)

Armazenar em temperatura de 15 a 30 °C. O prazo de validade é de 30 meses (para modelos PT-L2P-5 e PT-L2P-45) e de 12 meses (para modelo PT-L2P-1.5) quando adequadamente tampado e armazenado à temperatura de 15 a 30 °C.

## Eliminação

Descarte os kits não utilizados, danificados ou com vazamento de acordo com os regulamentos locais, estaduais e federais apropriados. Descartar como lixo de laboratório.

## Manutenção/reparos

Não aplicável. O prepIT•L2P é um reagente de laboratório - nenhuma manutenção ou reparo é necessário.

## Características de desempenho

- O prepIT•L2P destina-se à purificação de DNA genômico de produtos Oragene, kits de coleta OCD-100, OCR-100 e OC-175. Não é destinado a uso com OCD-100A.
- O prepIT•L2P está disponível em vários volumes, dependendo do número de preparações necessárias. Por exemplo,

Código do produto	Volume de preparação da amostra	Número de preparações
PT-L2P-1.5	0,5 mL	75
PT-L2P-5	0,5 mL	200
PT-L2P-45	0,5 mL	2,000

## Informações sobre patentes

Informações sobre patentes [www.dnagenotek.com/legalnotices](http://www.dnagenotek.com/legalnotices)

## **Garantias**

Os termos e condições completos para todos os produtos DNA Genotek estão em <http://www.dnagenotek.com/ROW/terms/index.html>

O Fornecedor garante ao Receptor que, no momento da transferência para o Receptor, o representante do receptor ou a transportadora comum (a) possui título bom e comercializável para os Produtos, livre de todos os ônus, e (b) todos os Produtos estão em conformidade com as especificações listadas no Produto, incluindo informações contidas em qualquer certificado de análise, no rótulo, na embalagem, no folheto informativo, no manual do usuário e em qualquer outra documentação que acompanha os Produtos e/ou fornecidos separadamente ao Receptor. As garantias aqui fornecidas não são transferíveis ou disponíveis para qualquer outro cliente ou usuário subsequente ao Receptor. O FORNECEDOR NÃO OFERECE OUTRAS GARANTIAS EXPRESSAS OU IMPLÍCITAS. O FORNECEDOR PELO PRESENTE REJEITA TODAS AS GARANTIAS EXPRESSAS OU IMPLÍCITAS, SEJAM IMPLÍCITAS PELA OPERAÇÃO DA LEI OU DE OUTRA FORMA, INCLUINDO, SEM LIMITAÇÃO, TODAS AS GARANTIAS IMPLÍCITAS DE COMERCIALIZAÇÃO E ADEQUAÇÃO A UM PROPÓSITO ESPECÍFICO. EXCETO QUANDO EXPRESSAMENTE ESTABELECIDO NESTE PARÁGRAFO, TODOS OS PRODUTOS E/OU SERVIÇOS FORNECIDOS PELO FORNECEDOR E SEUS COLABORADORES E AGENTES SÃO FORNECIDOS “TAL COMO ESTÃO” E “ONDE ESTÃO”. O FORNECEDOR NÃO SE RESPONSABILIZA PELOS RESULTADOS ALCANÇADOS PELO RECEPTOR USANDO O PRODUTO.

## **Solução de problemas**

Entre em contato com o suporte técnico da DNA Genotek em [support@dnagenotek.com](mailto:support@dnagenotek.com) ou ligue para +1 (613) 723-5757 opção 6.





# protocolo de laboratório prepIT® para purificação manual de DNA a partir de 0,5 mL de amostra

Para a purificação do DNA genômico dos produtos Oragene, kits de coleta OCD-100, OCR-100 e OC-175. Não é destinado a uso com OCD-100A.

O protocolo passo a passo a seguir descreve como purificar o DNA a partir de uma alíquota de 500 µL de amostra.

## Reagentes inclusos

prepIT®•L2P (# catálogo: PT-L2P)

## Equipamento e reagentes (não fornecidos)

- Microcentrífuga capaz de rodar a 15,000 × g
- Microtubos de 1,5 mL (por exemplo, Axygen # MCT-150-C)
- Incubadora de ar ou água a 50 °C
- Etanol (95% a 100%) em temperatura ambiente
- Etanol (70%) em temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de DNA: TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) ou solução semelhante

## Procedimento

Etapas de purificação	Notas
1. Misture a amostra no kit DNA Genotek por inversão e agitação suave por alguns segundos.	• Isso garantirá que as amostras viscosas sejam adequadamente misturadas.
2. Incubar a amostra a 50 °C em uma incubadora de água por no mínimo 1 hora ou em uma incubadora de ar por no mínimo 2 horas.	• Essa etapa de tratamento térmico é essencial para garantir que o DNA seja adequadamente liberado e que as nucleases sejam permanentemente inativadas. • Esta etapa de incubação pode ser realizada a qualquer momento após a coleta da amostra e antes da purificação.

Etapas de purificação	Notas
<p><b>Nota:</b> O uso de uma incubadora de ar pode ser preferível, pois os tubos de amostra podem flutuar em banho de água. Se for necessário usar um banho de água, verifique se a parte do tubo contendo a amostra permanece imersa em água.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toda a amostra deve ser incubada no tubo de coleta original antes da alíquota para garantir a homogeneidade da amostra.</li> <li>• A amostra pode ser incubada a 50 °C durante a noite, se for mais conveniente.</li> <li>• É necessário um tempo mais longo em uma incubadora de ar porque o equilíbrio da temperatura é mais lento do que em uma incubadora de água.</li> </ul>
<p>3. Transferir 500 µL da amostra misturada para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O restante da amostra pode ser armazenado em temperatura ambiente ou congelado (-15 °C a -20 °C).</li> </ul>
<p>4. Para 500 µL de amostra, adicione 20 µL (1/25 de volume) de PT-L2P ao tubo de microcentrifuga e misture em vórtex por alguns segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A amostra ficará turva à medida que as impurezas e inibidores forem precipitados.</li> </ul>
<p>5. Incubar no gelo por 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A incubação à temperatura ambiente pode ser substituída, mas será um pouco menos eficaz na remoção de impurezas.</li> </ul>
<p>6. Centrifugar em temperatura ambiente por 5 minutos a 15,000 × g.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Um período mais longo de centrifugação (até 15 minutos) pode ser benéfico na redução da turbidez (<math>A_{320}</math> alta) da solução final de DNA.</li> </ul>
<p>7. Transfira cuidadosamente o sobrenadante transparente com uma ponta de pipeta para um tubo de microcentrifuga novo. <b>Descarte o sedimento que contém impurezas.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O sedimento contém impurezas turvas. Se acidentalmente perturbado, o tubo deve ser novamente centrifugado.</li> </ul>

Etapas de purificação	Notas
<p>8. Para 500 <math>\mu\text{L}</math> de sobrenadante, adicione 600 <math>\mu\text{L}</math> de etanol de 95% a 100% em temperatura ambiente. Misture delicadamente por inversão 10 vezes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durante a mistura com etanol, o DNA será precipitado. Isso pode aparecer como um coágulo de fibras de DNA ou como um precipitado fino, dependendo da quantidade de DNA na amostra.</li> <li>• Mesmo que nenhum coágulo seja visto, o DNA será recuperado seguindo cuidadosamente os próximos passos.</li> </ul>
<p>9. Deixe a amostra repousar em temperatura ambiente por 10 minutos para permitir que o DNA se precipite completamente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A incubação a <math>-20\text{ }^{\circ}\text{C}</math> não é recomendada porque as impurezas podem co-precipitar com o DNA.</li> </ul>
<p>10. Coloque o tubo na microcentrífuga em uma orientação conhecida. Centrifugar à temperatura ambiente por 2 minutos a <math>15.000 \times g</math>.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Por exemplo, coloque cada tubo na microcentrífuga com a parte da dobradiça da tampa apontando para fora do centro do rotor. Após a centrifugação, a posição do grânulo pode ser localizada (mesmo que seja pequeno demais para ser facilmente visível), fica na ponta do tubo abaixo da dobradiça.</li> </ul>
<p>11. Remova cuidadosamente o sobrenadante com uma ponta de pipeta e descarte-o. Tome cuidado para evitar perturbar o sedimento de DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Este sedimento contém DNA. A perda do sedimento resultará na perda do DNA.</li> <li>• Girar o tubo de forma que o sedimento fique na parede superior permitirá mover com segurança uma ponta de pipeta ao longo da parede inferior e remover todo o sobrenadante.</li> <li>• O sobrenadante pode conter impurezas e deve ser removido o mais completamente possível.</li> <li>• A secagem excessiva do sedimento pode dificultar a dissolução do DNA.</li> </ul>

Etapas de purificação	Notas
<p>12. Lavagem com etanol: Adicione cuidadosamente 250 µL de etanol a 70%. Deixe descansar em temperatura ambiente por 1 minuto. <b>Remova completamente o etanol sem perturbar o sedimento.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>É importante remover todo o etanol da amostra. A transferência de etanol pode afetar o desempenho do ensaio.</b></li> <li>• Tome cuidado para não perturbar o sedimento de DNA.</li> <li>• O sedimento de DNA pode ser pequeno.</li> <li>• Se o sedimento se soltar, centrifugue a amostra por 5 minutos a 15.000 × g.</li> <li>• Após a remoção do etanol a 70%, o tubo pode ser girado por pulso para permitir a remoção do etanol residual.</li> </ul>
<p>13. Adicione 100 µL de solução de TE (consulte a página 3) para dissolver o sedimento de DNA. Agite no vortex por pelo menos 5 segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se uma concentração mais alta de DNA é desejada, 50 µL de TE devem ser usados.</li> <li>• <b>Nota:</b> grandes quantidades de DNA de alto peso molecular podem demorar a hidratar (dissolver) completamente.</li> <li>• A hidratação incompleta do DNA é uma causa de imprecisão na estimativa da concentração de DNA e de falha de aplicações a jusante, como a PCR.</li> </ul>
<p>14. Para garantir a reidratação completa do DNA (sedimento e esfregaço), incubar à temperatura ambiente durante a noite, seguido de vórtice ou a 50 °C por 1 hora com vórtice ocasional.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A reidratação incompleta do DNA é uma causa de imprecisão na estimativa da concentração de DNA e falha potencial de aplicações a jusante, como a PCR.</li> </ul>
<p>15. Opções para armazenamento do DNA totalmente reidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>a) <b>Recomendado</b> em TE, em alíquotas a -20 °C para armazenamento a longo prazo, ou</li> <li>b) <b>Em TE</b> a 4 °C até 2 meses.</li> </ol>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O congelamento do DNA purificado no TE fará com que o DNA precipite. Ao descongelar uma amostra de DNA purificado congelado, preste muita atenção à reidratação, conforme discutido na etapa 14.</li> </ul>

Visite nosso site em [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com) para obter uma versão em página inteira de cada protocolo e quaisquer idiomas adicionais. Referência PD-PR-006 para este protocolo.

# Protocolo de laboratório prepIT® para purificação manual de DNA de toda a amostra

Para a purificação do DNA genômico dos produtos Oragene, kits de coleta OCD-100, OCR-100 e OC-175. Não é destinado a uso com OCD-100A.

**Nota:** Este protocolo requer o uso de uma centrífuga capaz de gerar pelo menos  $3.500 \times g$  para obter os melhores resultados.

O procedimento é descrito para purificar o DNA de toda a amostra coletada (aproximadamente 1 mL a 4 mL de volume total). Os volumes mostrados devem ser ajustados para o volume real coletado.

## Reagentes incluídos

prepIT®•L2P (# catálogo: PT-L2P)

## Equipamento e reagentes (não fornecidos)

- Centrífuga que acomoda tubos de 15 mL e é capaz de gerar pelo menos  $3.500 \times g$  (consulte a Tabela 2 na contracapa)
- Tubos cônicos de polipropileno de 15 mL (por exemplo, BD Falcon #352196)
- Microcentrífuga capaz de funcionar a  $15.000 \times g$  (opcional)
- Microtubos de 1,5 mL (por exemplo, Axygen # MCT-150-C)
- Incubadora de ar ou água a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$
- Etanol (95% a 100%) em temperatura ambiente
- Etanol (70%) em temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de DNA: TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) ou solução semelhante


## Verificação de pré-purificação


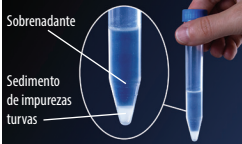
Pese a amostra para estimar a quantidade de saliva fornecida pelo doador (consulte a Tabela 1; não é necessário para o OCD-100, OCR-100 ou OC-175). A quantidade de saliva coletada é diretamente proporcional à quantidade de DNA recuperado. Como exemplo, se um doador tiver fornecido menos de 2 mL de saliva, você deve recuperar um rendimento total menor dessa amostra. Do mesmo modo, um doador que forneça mais de 2 mL de saliva deve resultar em maior rendimento total.

Peso do kit (sem amostra)	Tabela 1	
<p>Quando uma amostra chega ao laboratório, sugerimos pesar a amostra para estimar se a quantidade certa de saliva foi fornecida pelo doador. Você pode esperar alguma variabilidade entre os doadores, conforme determinado pelo peso do kit acionado com a amostra. O peso médio de um kit vazio é fornecido (Tabela 1). Para calcular a quantidade de amostra coletada (assumindo 1 g/mL), execute a seguinte subtração:</p> <p>Peso do kit contendo a amostra            – Peso do kit sem amostra =            Quantidade de amostra coletada</p>	<b>Número do produto</b>	<b>Peso do kit sem amostra</b>
	OG-250 OGR-250	14,15 g
	OG-500 OGD-500 OGR-500 OG-600* OGD-600* OGR-600*	6,81 g
	OG-510 OGD-510 OG-610* OGD-610*	5,83 g
	OG-520	5,41 g
	OG-575 OGD-575 OGR-575 OG-675* OGD-675* OGR-675*	5,66 g
	ON-500 ON-600*	6,47 g
	* Os kits com códigos de barras 2D inferiores são 1 g mais pesados que o respectivo kit sem códigos de barras.	

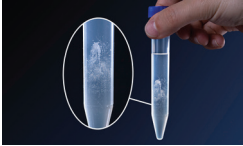
## Procedimento

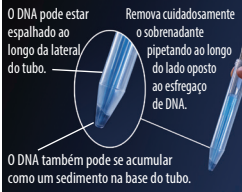
Etapas de purificação	Notas
1. Misture a amostra no kit DNA Genotek por inversão e agitação suave por alguns segundos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isso deve garantir que as amostras viscosas sejam adequadamente misturadas.</li> </ul>


Etapas de purificação	Notas
<p>2. Incubar a amostra a 50 °C em uma incubadora de água por no mínimo 1 hora ou em uma incubadora de ar por no mínimo 2 horas.</p> <p><b>Nota:</b> O uso de uma incubadora de ar pode ser preferível, pois os tubos de amostra podem flutuar em banho-maria. Se for necessário usar um banho de água, verifique se a parte do tubo contendo a amostra permanece imersa em água.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esta etapa de tratamento térmico é essencial para maximizar o rendimento de DNA e garantir que as nucleases sejam permanentemente inativadas.</li> <li>• Isso deve ser feito no tubo de coleta original.</li> <li>• A amostra pode ser incubada a 50 °C durante a noite, se for mais conveniente.</li> <li>• Esta etapa de incubação pode ser realizada a qualquer momento após a coleta da amostra e antes da purificação do DNA.</li> <li>• É necessário um tempo mais longo em uma incubadora de ar porque o equilíbrio da temperatura é mais lento do que em uma incubadora de água.</li> </ul>
<p>3. Transfira a amostra inteira para um tubo de centrifuga de 15 mL (Figura 1). Anote o volume da amostra.</p>  <p><i>Figura 1: Antes de prosseguir para a Etapa 4, verifique se toda a amostra foi incubada e transferida para um novo tubo de centrifuga de 15 mL, como mostrado.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A transferência pode ser realizada por derramamento ou pipetagem com uma pipeta de vidro ou plástico.</li> </ul>

Etapas de purificação	Notas
<p>4. Adicione 1/25 do volume do PT-L2P e agite em vórtex por alguns segundos. (Figura 2)</p>  <p><i>Figura 2: Após adicionar o PT-L2P e incubar no gelo por 10 minutos, a amostra não ficará mais clara, mas sim uma solução turva.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• por exemplo, 160 µL para 4 mL de amostra para cada tubo.</li> <li>• A amostra ficará turva à medida que as impurezas e inibidores forem precipitados.</li> </ul>
<p>5. Incubar no gelo por 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A incubação à temperatura ambiente pode ser substituída, mas será menos eficaz na remoção de impurezas.</li> </ul>
<p>6. Centrifugue em temperatura ambiente por 10 minutos na velocidade mais alta possível. Mínimo 3,500 × g. Qualquer centrífuga, balde articulado ou rotor angular que possa gerar essa força-g é adequada.</p>  <p><i>Figura 3: Após a centrifugação, haverá um acúmulo de material turvo na base do tubo. O sobrenadante deve estar visivelmente claro.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uma força centrífuga mais alta minimiza a quantidade de material turvo que será transportado para o DNA purificado (Figura 3).</li> <li>• Antes de prosseguir, verifique com o fabricante do tubo se os tubos de centrífuga de 15 mL podem suportar a força centrífuga.</li> <li>• Um período mais longo de centrifugação (até 20 minutos) pode ser realizado onde a redução da turbidez da solução final de DNA é considerada importante.</li> </ul>



Etapas de purificação	Notas
<p>7. Transfira cuidadosamente a maior parte do sobrenadante transparente com uma pipeta para um tubo de centrifuga novo de 15 mL. <b>Descarte o sedimento.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Deixe um pequeno volume do sobrenadante para trás para evitar perturbar o sedimento. O sedimento contém impurezas turvas.</li> </ul>
<p>8. Adicione 1,2x volume de etanol de 95% a 100% à temperatura ambiente ao sobrenadante transparente. Misture delicadamente por inversão 10 vezes.</p>  <p><i>Figura 4: Após a adição de etanol, o DNA precipitará, o que <b>pode</b> resultar em um coágulo visível de fibras.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durante a mistura com etanol, o DNA será precipitado. O DNA precipitado pode aparecer como um coágulo de fibras de DNA (Figura 4). Mesmo que nenhum coágulo seja visto, o DNA será recuperado nas etapas a seguir.</li> </ul>
<p>9. Deixe a amostra repousar em temperatura ambiente por 10 minutos para permitir que o DNA se precipite completamente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A incubação a -20 °C não é recomendada porque as impurezas podem co-precipitar com o DNA.</li> </ul>
<p>10. Centrifugue em temperatura ambiente por 10 minutos na velocidade mais alta possível. Mínimo 3,500 × g.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É necessária uma velocidade mínima da centrífuga de 3.500 × g (consulte a Tabela 2 na contracapa). Qualquer centrífuga, balde giratório ou rotor angular que possa gerar essa força-g é adequada.</li> </ul>

Etapas de purificação	Notas
<p>11. Remova cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta de vidro ou plástico e descarte-o. Tome cuidado para evitar perturbar o sedimento de DNA.</p>  <p>O DNA pode estar espalhado ao longo da lateral do tubo.</p> <p>Remove cuidadosamente o sobrenadante pipetando ao longo do lado oposto ao esfregamento de DNA.</p> <p>O DNA também pode se acumular como um sedimento na base do tubo.</p> <p><i>Figura 5: Usar uma ponta de pipeta para arranhar suavemente ao longo do interior do tubo pode revelar a presença de um esfregamento de DNA.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O sobrenadante pode conter impurezas e deve ser removido o mais completamente possível.</li> <li>• O DNA precipitado será encontrado como um sedimento no fundo do tubo e possivelmente como uma mancha na lateral do tubo (Figuras 5).</li> <li>• O esfregamento de DNA pode estar localizado na lateral do tubo, voltado para o centro da centrifuga.</li> <li>• Uma mancha pode ser localizada usando o teste de "arranhão". Você pode verificar a presença de um esfregamento de DNA arranhando a parte interna do tubo usando uma ponta P1000. Um esfregamento, como mostrado na figura 5, pode estar visível.</li> </ul>
<p>12. Lavagem com etanol: Adicione cuidadosamente 1 mL de etanol a 70% ao tubo sem perturbar o esfregamento ou o sedimento. Deixe repousar à temperatura ambiente por 1 minuto. Agite suavemente e <b>remova completamente o etanol, tomando cuidado para não perturbar o granulado e o esfregamento.</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>É importante remover todo o etanol da amostra. A transferência de etanol pode afetar o desempenho do ensaio.</b></li> <li>• Tome cuidado para não perturbar o sedimento de DNA ou o esfregamento.</li> <li>• Uma centrifugação curta (menos de 1 minuto) pode ser realizada para facilitar a remoção completa do sobrenadante.</li> <li>• Se o sedimento se destacar após a etapa de lavagem com etanol, centrifugue a amostra por 5 minutos na velocidade mais alta possível. Mínimo 3,500 × g.</li> </ul>

Etapas de purificação	Notas
<p>13. Reidrate o DNA adicionando 0,2 - 1 mL de solução de TE e agitando a amostra no vórtex por 30 segundos.</p> <p>Para OCD-100 e OCR-100, reidrate o DNA adicionando 0,2 mL da solução de TE e agite a amostra no vórtex por 30 segundos.</p>  <p><i>Figura 6: Fazer o vórtice da amostra por 30 segundos permitirá recuperar o DNA espalhado na lateral do tubo. O DNA permanecerá com alto peso molecular.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se uma concentração mais alta de DNA é desejada, o volume de TE pode ser reduzido. Deve ser usado um mínimo de 200 µL de solução TE.</li> <li>• A secagem excessiva do sedimento (&gt; 10 minutos) e o uso de menos de 500 µL de solução de TE pode dificultar a reidratação (dissolução) do DNA e diminuir o rendimento ou dificultar a quantificação.</li> <li>• O DNA precipitado será encontrado como um sedimento no fundo do tubo e, possivelmente, como uma mancha na lateral do tubo.</li> <li>• Para garantir a recuperação máxima do DNA, a amostra deve ser submetida a vórtice após a adição de solvente de DNA (solução de TE). O vórtice garantirá que o DNA manchado na lateral do tubo seja recuperado (Figura 6).</li> <li>• Não hesite em agitar a amostra no vórtex, pois o DNA permanecerá com alto peso molecular.</li> </ul>
<p>14. Para garantir a reidratação completa do DNA (sedimento e esfregaço), incubar à temperatura ambiente durante a noite, seguido de vórtice ou a 50 °C por 1 hora com vórtice ocasional.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A reidratação incompleta do DNA é uma causa de imprecisão na estimativa da concentração de DNA e falha potencial de aplicações a jusante, como a PCR.</li> </ul>
<p>15. Transfira o DNA reidratado para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL para armazenamento.</p>	

Etapas de purificação	Notas
<p>Etapa opcional:</p> <p>a) <b>Centrifugue</b> o DNA re-hidratado à temperatura ambiente por 15 minutos a <math>15.000 \times g</math>.</p> <p>b) <b>Transfira</b> o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL sem perturbar o sedimento.</p>	<p>Observe que o sedimento contém material turvo e insolúvel.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Para maximizar a recuperação do DNA, verifique se o DNA está completamente reidratado (etapa 14) antes de executar esta etapa de centrifugação.</li> <li>• Esta etapa de centrifugação garante que qualquer material turvo restante seja removido da amostra de DNA.</li> <li>• Deve-se tomar cuidado para não perturbar o sedimento ao transferir o sobrenadante transparente para um tubo novo.</li> </ul>
<p>16. Opções para armazenamento do DNA totalmente reidratado:</p> <p>a) <b>Recomendado</b> em TE, em alíquotas a <math>-20\text{ °C}</math> para armazenamento a longo prazo, ou</p> <p>b) <b>Em TE</b> a <math>4\text{ °C}</math> até 2 meses.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O congelamento do DNA purificado em TE pode causar a precipitação do DNA. Ao descongelar o DNA purificado congelado, preste muita atenção à reidratação, conforme discutido na etapa 14.</li> </ul>

Visite nosso site em **[www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com)** para obter uma versão em página inteira de cada protocolo e quaisquer idiomas adicionais. Referência PD-PR-015 para este protocolo.

# Protocolo de laboratório prepIT® para purificação manual de DNA de 0,5 mL usando uma placa profunda de 96 poços

Para a purificação do DNA genômico dos produtos Oragene, kits de coleta OCD-100, OCR-100 e OC-175. Não é destinado a uso com OCD-100A.

O seguinte protocolo passo a passo descreve como purificar alíquotas de 500 µL de várias amostras simultaneamente usando uma placa profunda de 96 poços.

## Reagentes incluídos

prepIT®•L2P (# catálogo: PT-L2P)

## Equipamento e reagentes (não fornecidos)

- Placas e tampas - placas profundas de 96 poços (redondas) (por exemplo, Axygen Cat. No. P-DW-20-C) com esteira reutilizável de 96 poços ou folha de cobertura adesiva (por exemplo, Axygen Cat. No. AM-2ML- RD-IMP)
- Centrifugar com balde para acomodar placas de 96 poços. Capaz de um mínimo de 3.500 × g. (por exemplo, centrífuga Sorvall modelo RT 6000D com adaptador de placa PN 11093 de 96 poços)
- -20°C congelador
- Blue Dextran (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich Cat. No. D5751)
- Isopropanol à temperatura ambiente
- Etanol a 70% à temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de DNA: TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0)
- Pipetador de 8 ou 12 canais (opcional)

## Procedimento

Etapas de purificação	Notas
1. Misture a amostra no kit DNA Genotek por inversão e agitação suave por alguns segundos.	• Isso deve garantir que as amostras viscosas sejam adequadamente misturadas.

Etapas de purificação	Notas
<p>2. Incubar a amostra a 50 °C em uma incubadora de água por no mínimo 1 hora ou em uma incubadora de ar por no mínimo 2 horas.</p> <p><b>Nota:</b> O uso de uma incubadora de ar pode ser preferível, pois os tubos de amostra podem flutuar em banho-maria. Se for necessário usar um banho de água, verifique se a parte do tubo contendo a amostra permanece imersa em água.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Essa etapa de tratamento térmico é essencial para garantir que o DNA seja adequadamente liberado e que as nucleases sejam permanentemente inativadas.</li> <li>• Esta etapa de incubação pode ser realizada a qualquer momento após a coleta da amostra e antes da purificação.</li> <li>• Toda a amostra deve ser incubada no tubo de coleta original antes da alíquota para garantir a homogeneidade da amostra.</li> <li>• A amostra pode ser incubada a 50 °C durante a noite, se for mais conveniente.</li> <li>• É necessário um tempo mais longo em uma incubadora de ar porque o equilíbrio da temperatura é mais lento do que em uma incubadora de água.</li> </ul>
<p>3. Adicione 20 µL de PT-L2P a cada poço da placa.</p>	
<p>4. Transfira 5 µL de Blue Dextran (1 mg/mL) para cada poço da placa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O Blue Dextran ajuda a tornar o sedimento de DNA mais visível durante a etapa de precipitação do DNA.</li> </ul>
<p>5. Transfira 500 µL da amostra para cada poço.</p>	
<p>6. Cubra a placa com capa adesiva ou esteira reutilizável. Pressione no lugar para selar. Misture manualmente por inversão 5 vezes.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Garanta uma vedação firme para cada poço.</li> <li>• A amostra ficará turva à medida que as impurezas e inibidores forem precipitados.</li> </ul>
<p>7. Incubar a -20 °C por 10 minutos.</p>	
<p>8. Centrifugue a placa em temperatura ambiente por 10 minutos a 4.200 × g.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Recomenda-se que todas as etapas de centrifugação no protocolo sejam realizadas a 4.200 × g. No entanto, se a centrífuga for incapaz de 4.200 × g, é aceitável um mínimo de 3.500 × g.</li> </ul>

Etapas de purificação	Notas
9. Durante a centrifugação, identifique uma segunda placa de 96 poços.	
10. Quando a centrífuga parar, transfira 450 µL do sobrenadante da primeira placa para a segunda placa. <b>Tome cuidado para não perturbar o sedimento.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O sedimento contém impurezas turvas. Descarte a placa que contém os sedimentos assim que o sobrenadante for transferido.</li> </ul>
11. Para a nova placa que contém o sobrenadante, adicione 350 µL de isopropanol (temperatura ambiente) a cada poço.	
12. Cubra a placa com capa adesiva ou esteira reutilizável. Pressione no lugar para selar. Misture manualmente invertendo lentamente 10 vezes. Incubar em temperatura ambiente por 10 minutos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durante a mistura com isopropanol, o DNA será precipitado. Isso pode aparecer como um coágulo de fibras de DNA ou como um precipitado fino, dependendo da quantidade de DNA na amostra.</li> <li>• Mesmo que nenhum coágulo seja visto, o DNA será recuperado seguindo cuidadosamente os próximos passos.</li> </ul>
13. Centrifugue a placa em temperatura ambiente por 10 minutos a $4.200 \times g$ .	
14. Remova com cuidado o máximo de sobrenadante possível de cada poço, sem perturbar o sedimento. Descarte o sobrenadante.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Este passo deve ser realizado com uma pipeta de ponta única para evitar perturbar o sedimento. Alguns sedimentos podem estar grudados na lateral do poço, tome cuidado para não removê-los com a pipeta.</li> <li>• Este sedimento contém DNA. A perda do sedimento resultará na perda do DNA.</li> </ul>

Etapas de purificação	Notas
15. Adicione 400 µL de etanol a 70% (temperatura ambiente) a cada poço.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tome cuidado para não perturbar o sedimento de DNA.</li> <li>• O sedimento de DNA pode ser pequeno.</li> <li>• A lavagem com etanol a 70% ajuda a remover inibidores residuais.</li> </ul>
16. Cubra a placa com capa adesiva ou esteira reutilizável. Pressione no lugar para selar. Misture com vórtice vigoroso.	
17. Centrifugue a placa em temperatura ambiente por 10 minutos a $4.200 \times g$ .	
18. <b>Remova cuidadosamente TODO o sobrenadante de cada poço, sem perturbar o sedimento.</b> Descarte o sobrenadante.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para evitar perturbar o sedimento, recomenda-se o uso de uma pipeta de canal único para esta etapa.</li> <li>• <b>É importante remover todo o etanol da amostra. A transferência de etanol pode afetar o desempenho do ensaio.</b></li> </ul>
19. A placa deve ser centrifugada em pulsos por 20 segundos para coletar qualquer sobra de etanol.	
20. Usando uma pipeta, remova cuidadosamente <b>TODO</b> o etanol residual e seque a placa ao ar por 5 minutos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para evitar perturbar o sedimento, recomenda-se o uso de uma pipeta de canal único para esta etapa.</li> </ul>
21. Adicione 50-100 µL de tampão TE a cada poço e cubra a placa com uma folha adesiva ou uma esteira reutilizável.	



Etapas de purificação	Notas
<p>22. Agite no vortex vigorosamente para garantir que qualquer sedimento na lateral do poço seja desalojado e re-hidratado. Coloque a placa em um agitador para ajudar a reidratar totalmente o sedimento de DNA durante a noite.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Para aumentar a taxa de hidratação do DNA e maximizar a recuperação, a amostra pode ser incubada por 1 hora a 50 °C com vórtice ocasional.</li> </ul>
<p>23. Opções para armazenamento do DNA totalmente reidratado:</p> <p>a) <b>Recomendado</b> em TE, em alíquotas a -20 °C para armazenamento a longo prazo, ou</p> <p>b) <b>Em TE</b> a 4 °C até 2 meses.</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O congelamento do DNA purificado no TE fará com que o DNA precipite. Ao descongelar uma amostra de DNA purificado congelado, siga as instruções de aquecimento da nota na etapa 22 para garantir a reidratação completa.</li> </ul>

Visite nosso site em [www.dnagenotek.com](http://www.dnagenotek.com) para obter uma versão em página inteira de cada protocolo e quaisquer idiomas adicionais. Referência PD-PR-052 para este protocolo.

## Quantificação de DNA

### *Pelo método de fluorescência*

Os ensaios que usam corantes fluorescentes são mais específicos do que a absorvância a 260 nm para quantificar a quantidade de DNA de fita dupla (dsDNA) em uma amostra de DNA. Recomendamos o uso de corantes fluorescentes como PicoGreen® ou SYBR® Green I para quantificar o dsDNA, pois há menos interferência pela contaminação do RNA. Um protocolo barato usando SYBR Green I é descrito em PD-PR-075, *quantificação de DNA usando SYBR Green I Dye e um leitor de microplacas*<sup>1</sup>. Como alternativa, podem ser usados kits comercialmente disponíveis, como o kit de teste dsDNA Quant-iT™ PicoGreen da Invitrogen (Cat. Q-33130). Para qualquer protocolo, recomendamos que o DNA purificado seja diluído a 1:50 com solução TE e que 5 µL sejam usados no ensaio de quantificação.

### *Pelo método da absorvância*

Se você optar por quantificar o DNA por absorvância, recomendamos que você trate primeiro a amostra purificada com RNase para digerir o RNA contaminante e, em seguida, remova os fragmentos de RNA por precipitação com etanol do DNA. Um protocolo detalhado é descrito em PD-PR-040, *remoção de RNA por digestão com dupla RNase*<sup>2</sup>. Observe que o DNA de uma amostra oral geralmente contém muito mais RNA do que o encontrado nas amostras de sangue. Certifique-se de que o DNA precipitado por álcool esteja totalmente dissolvido antes de ler a absorvância.

**Fator de conversão:** Uma absorvância de 1,0 a 260 nm corresponde a uma concentração de 50 ng/µL (50 µg/mL) para dsDNA puro.

Certifique-se de que os valores de absorvância estejam dentro da faixa linear do espectrofotômetro. Dilua e meça novamente as amostras que estão fora da faixa linear. Consulte a documentação do seu instrumento para obter mais informações.

## Referências

- <sup>1</sup> DNA quantification using the Fluorescence/DNase (F/D) assay. Replaced by DNA quantification using SYBR Green I dye and a micro-plate reader. DNA Genotek. PD-PR-075.
- <sup>2</sup> RNA removal by double-RNase digestion. DNA Genotek. PD-PR-040.

**Método:**

1. Dilua uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  de DNA tratado com RNase purificado com 90  $\mu\text{L}$  de TE (diluição 1/10). Misture pipetando suavemente para cima e para baixo. Aguarde até que as bolhas se dissipem.
2. Use TE na célula de referência (em branco).
3. Meça a absorvância a 320 nm, 280 nm e 260 nm.
4. Calcule os valores corrigidos de  $A_{280}$  e  $A_{260}$  subtraindo a absorvância a 320 nm ( $A_{320}$ ) dos valores de  $A_{280}$  e  $A_{260}$ .
5. Concentração de DNA em  $\text{ng}/\mu\text{L}$  =  $A_{260} \times 10$  corrigido (fator de diluição)  $\times 50$  (fator de conversão).
6. Relação  $A_{260}/A_{280}$ : divida  $A_{260}$  corrigido por  $A_{280}$  corrigido.

**Exemplo**

1. Assuma o  $A_{320} = 0,025$ ,  $A_{280} = 0,175$  e  $A_{260} = 0,295$  medido
2. A concentração de DNA da amostra não diluída será:  
 $(A_{260} - A_{320}) \times 10$  [fator de diluição]  $\times 50$  [fator de conversão]  
 $= (0,295 - 0,025) \times 10 \times 50$   
 $= 0,270 \times 10 \times 50$   
 $= 135 \text{ ng}/\mu\text{L}$  or  $135 \text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$
3. A proporção  $A_{260}/A_{280}$  corrigida será:  
 $(A_{260} - A_{320}) \div (A_{280} - A_{320})$   
 $= (0,296 - 0,025) \div (0,175 - 0,025)$   
 $= 0,270 \div 0,150$   
 $= 1,80$

### Tabela 2: Cálculo da força-g do raio e velocidade do rotor

Para gerar uma força-g mínima de  $3.500 \times g$ , você deve selecionar uma velocidade de rotação (RPM) adequada ao tamanho do seu rotor. Destacadas abaixo estão as combinações de velocidade de rotação e raio do rotor que gerarão a força-g mínima necessária.

por exemplo, se sua centrífuga tiver um raio de rotor de 10 cm, você deverá selecionar uma velocidade de rotação mínima de 6.000 RPM. Lembre-se de que  $3.500 \times g$  é o requisito mínimo. Você deve girar suas amostras na velocidade mais alta que sua centrífuga pode suportar e produzir uma força que seus tubos possam suportar.

Tabela 2: Raio do rotor (cm)

RPM	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
4,000	1,253	1,432	1,611	1,790	1,049	1,969	2,148	2,328	2,507	2,865	3,044	3,223
4,500	1,586	1,813	2,039	2,266	2,493	2,719	2,946	3,172	3,399	3,626	3,852	4,079
5,000	1,958	2,238	2,518	2,798	3,077	3,357	3,637	3,917	4,196	4,476	4,756	5,036
5,500	2,369	2,708	3,046	3,385	3,723	4,062	4,400	4,739	5,077	5,416	5,754	6,036
6,000	2,820	3,223	3,626	4,028	4,431	4,834	5,237	5,640	6,043	6,445	6,848	7,251
6,500	3,309	3,782	4,255	4,728	5,201	5,673	6,146	6,619	7,092	7,564	8,037	8,510
7,000	3,838	4,386	4,935	5,483	6,031	6,580	7,128	7,676	8,225	8,773	9,321	9,870
7,500	4,406	5,036	5,665	6,294	6,924	7,553	8,183	8,812	9,442	10,071	10,700	11,330
8,000	5,013	5,729	6,445	7,162	7,878	8,594	9,310	10,026	10,742	11,459	12,175	12,891
8,500	5,659	6,468	7,276	8,085	8,893	9,702	10,510	11,319	12,127	12,936	13,744	14,553
9,000	6,345	7,251	8,158	9,064	9,970	10,877	11,783	12,689	13,596	14,502	15,409	16,315

força-g

