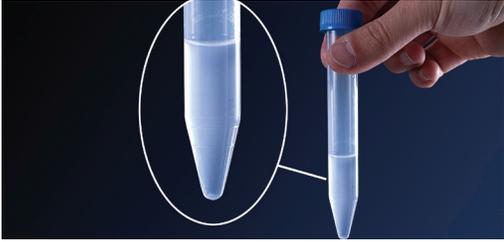
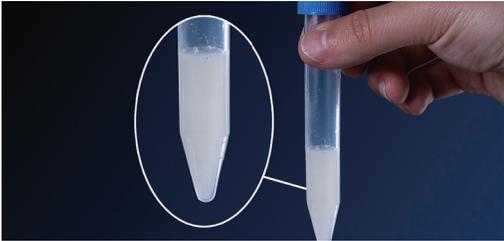
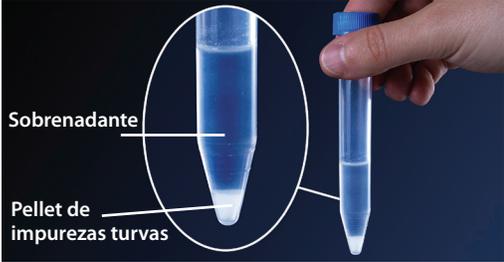
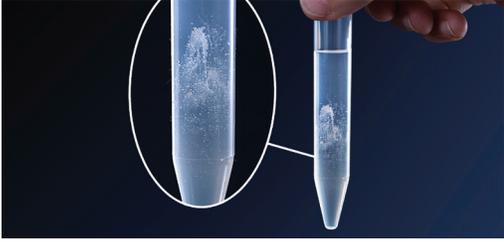
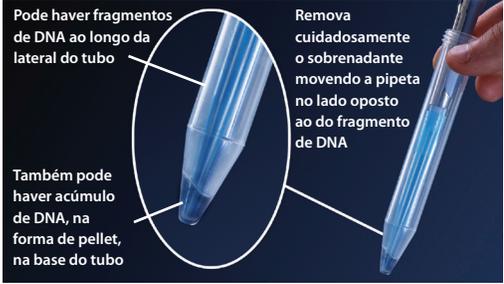


Procedimento

Etapas da purificação	Observações
<p>1. Misture a amostra no kit DNA Genotek, invertendo-o e agitando-o delicadamente por alguns segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> O objetivo é assegurar que amostras viscosas sejam adequadamente misturadas.
<p>2. Incube a amostra a 50°C em uma incubadora de água por pelo menos 1 hora ou em uma incubadora de ar por pelo menos 2 horas.</p> <p>Obs.: O uso de uma incubadora pode ser preferível, pois tubos de amostras podem flutuar em uma banheira com água. Se for necessário usar uma banheira, certifique-se de que a parte do tubo que contém a amostra se mantenha imersa na água.</p>	<ul style="list-style-type: none"> A etapa de tratamento a quente é essencial para aumentar a quantidade de DNA obtida e assegurar que as nucleases sejam permanentemente inativadas. É necessário que isso seja feito no tubo coletor original. Se for mais conveniente, a amostra pode ser incubada a 50°C durante a noite. A etapa de incubação pode ser realizada a qualquer momento após a coleta da amostra e antes da purificação do DNA. O tempo de incubação deve ser mais longo se for usada uma incubadora de ar, porque o equilíbrio térmico é mais lento do que em uma incubadora de água.
<p>3. Transfira a amostra inteira para uma centrífuga 15 mL (Figura 1). Observe o volume da amostra.</p>  <p><i>Figura 1: Antes de passar para a etapa 4, certifique-se de que a amostra inteira tenha sido incubada e transferida para um tubo de centrífuga novo, conforme a ilustração.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> A transferência pode ser realizada por despejamento ou com uma pipeta de vidro ou plástico.
<p>4. Acrescente 1/25 do volume de PT-L2P e misture por turbilhonamento durante alguns segundos (Figura 2).</p>  <p><i>Figura 2: Depois de se acrescentar o PT-L2P e incubar no gelo por 10 minutos, a amostra perderá a limpidez, ganhando a aparência de uma solução turva.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> P. ex.: 160 µL de amostra para cada tubo. A amostra ficará turva devido à precipitação de impurezas e inibidores.

Etapas da purificação	Observações
5. Incube no gelo por 10 minutos.	<ul style="list-style-type: none"> • Pode-se empregar incubação à temperatura ambiente, mas isso será menos eficaz na remoção de impurezas.
<p>6. Centrifugue a temperatura ambiente por 10 minutos na maior velocidade possível (mínimo de $3,500 \times g$). Pode-se usar qualquer centrífuga, com rotor horizontal (swinging-bucket) ou rotor de ângulo, que possa gerar essa força G.</p>  <p>Figura 3: Após a centrifugação, haverá acúmulo de material turvo na base do tubo. O sobrenadante deverá ser nitidamente transparente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O aumento da força de centrifugação reduz ao mínimo a quantidade de material turvo que será transferido para o DNA purificado (Figura 3). • Antes de prosseguir, verifique com o fabricante do tubo se os tubos de centrifuga de 15 mL suportam a força centrífuga. • O período de centrifugação pode ser mais longo (até 20 minutos) nos casos em que reduzir a turbidez da solução final de DNA seja muito importante.
<p>7. Usando uma pipeta, transfira cuidadosamente a maior parte do sobrenadante transparente para um tubo de centrifuga de 15 mL frio. Descarte o pellet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Despreze um pequeno volume do sobrenadante para evitar perturbações no pellet, que contém impurezas turvas.
<p>8. Acrescente 1,2 vezes o volume de etanol 95%-100% ao sobrenadante transparente. Misture com cuidado, invertendo 10 vezes.</p>  <p>Figura 4: Depois do acréscimo do etanol, o DNA se precipitará podendo resultar em um aglomerado de fibras visível.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • No processo de mistura com etanol, o DNA se precipitará. O DNA precipitado pode ter a aparência de um aglomerado de fibras de DNA (Figura 4). Mesmo que não haja aglomerado visível, o DNA será recuperado nas próximas etapas.
<p>9. Deixe a amostra repousar à temperatura ambiente por 10 minutos, para permitir a precipitação integral do DNA.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Incubação a -20°C não é recomendável, pois poderá haver coprecipitação de impurezas com o DNA.
<p>10. Centrifugue a temperatura ambiente por 10 minutos na maior velocidade possível (mínimo de $3,500 \times g$).</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É necessário centrifugar a velocidade mínima de $3,500 \times g$ (consulte a Tabela 2). Pode-se usar qualquer centrífuga, com rotor horizontal (swinging-bucket) ou rotor de ângulo, que possa gerar essa força G.

Etapas da purificação	Observações
<p>11. Remova cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta de vidro ou plástico e descarte-a. Evite perturbações do pellet de DNA.</p>  <p><i>Figura 5: Exemplo de um teste de indentação deslizante ("scratch test"): o uso da ponta de uma pipeta para arrastar suavemente o interior do tubo na vertical pode revelar a presença de um fragmento de DNA.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • O sobrenadante pode conter impurezas, e sua remoção deve ser o mais completa possível. • DNA precipitado será encontrado em forma de pellet na parte inferior do tubo e, possivelmente, em um fragmento na lateral do tubo. • O fragmento de DNA pode se localizar na lateral do tubo, voltado para a direção oposta ao centro da centrifuga. • É possível localizar fragmentos fazendo o "scratch test". Basta arrastar o interior do tubo com a ponta de uma P1000. Como mostra a Figura 5, um fragmento pode se tornar visível.
<p>12. Lavagem com etanol: Cuidadosamente adicione 1 mL de etanol 70% ao tubo sem prejudicar o fragmento ou o pellet de DNA. Deixe repousar à temperatura ambiente por 1 minuto. Gire com delicadeza e remova totalmente o etanol, tomando cuidado para não prejudicar o pellet e o fragmento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É importante retirar todo o etanol da amostra. O transporte de etanol pode comprometer o desempenho do ensaio. • Tome cuidado para não causar perturbações no pellet de DNA. • Uma centrifugação rápida (menos de 1 minuto) pode ser realizada para facilitar a remoção completa do sobrenadante. • Se o pellet se desprender após a lavagem com etanol, centrifugue a amostra por 5 minutos na maior velocidade possível (no mínimo, 3,500 × g).
<p>13. Reidrate o DNA acrescentando 0,5 mL–1 mL de solução de ET e turbilhonando a amostra por 30 segundos.</p> <p>Para o OC-100 e o OCR-100, reidrate o DNA acrescentando 0,2 mL de solução de ET e turbilhonando a amostra por 30 segundos.</p>  <p><i>Figura 6: Turbilhonar a amostra por 30 segundos lhe permitirá recuperar DNA fragmentado na lateral do tubo. O DNA manterá alto peso molecular.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se o objetivo for obter concentração mais alta de DNA, o volume de ET poderá ser reduzido. Deve-se usar pelo menos 200 µL de solução de ET. • Permitir uma secagem excessiva do pellet (> 10 minutos) e o uso de menos do que 500 µL de solução de ET pode dificultar a reidratação (dissolução) do DNA e diminuir a quantidade obtida ou dificultar a quantificação. • DNA precipitado será encontrado na forma de pellet no fundo do tubo e, possivelmente, em fragmento na lateral do tubo. • Para assegurar recuperação máxima de DNA, a amostra deve ser turbilhonada após a adição de solvente de DNA (solução de ET). O turbilhamento garantirá a recuperação do DNA fragmentado na lateral do tubo. • Não hesite quanto a turbilhonar a amostra, pois o DNA manterá alto peso molecular.

Etapas da purificação	Observações
14. Para assegurar a completa reidratação do DNA (pellet e fragmento na lateral do tubo) incube em temperatura ambiente durante a noite em seguida agite no vortex ou incube a 50°C por 1 hora com agitações ocasionais no vortex.	<ul style="list-style-type: none"> A reidratação incompleta do DNA causa imprecisão na estimativa da concentração de DNA e possíveis falhas em aplicações posteriores, como CR.
15. Transfira o DNA reidratado para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, para armazenagem.	
<p>Etapa opcional:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugue o DNA reidratado à temperatura ambiente por 15 minutos a 15,000 × g. Transfira o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL frio, sem causar perturbações ao pellet. 	<p>Observe que o pellet contém material turvo insolúvel.</p> <ul style="list-style-type: none"> Para aumentar ao máximo a recuperação de DNA, certifique-se de que o DNA esteja completamente reidratado (etapa 14) antes de realizar esta etapa de centrifugação. Esta etapa de centrifugação assegura que qualquer material turvo remanescente seja removido da amostra de DNA. É preciso tomar cuidado para não prejudicar o pellet ao transferir o sobrenadante transparente para o tubo frio.
<p>16. Opções para a armazenagem de DNA completamente reidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> Para armazenagem a longo prazo, recomenda-se ET, em alíquotas, a -20°C, ou ET a 4°C para até 2 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> O congelamento de DNA purificado em ET pode causar precipitação do DNA. Ao descongelar DNA purificado, preste muita atenção na reidratação, conforme discutido na etapa 14.

Quantificação do DNA

Pelo método fluorescente

Análises que usam tintas fluorescentes são mais específicas que a absorção a 260 nm para quantificar o DNA de fita dupla (dsDNA) em uma amostra de DNA. Recomendamos usar tintas fluorescentes tais como PicoGreen® ou SYBR® Green I para quantificar o dsDNA, pois há menos interferência do RNA contaminante. Um protocolo não dispendioso usando a SYBR Green I é descrito em PD-PR-075, *DNA quantification using SYBR Green I Dye and a micro-plate reader*¹. Uma alternativa é usar kits comerciais tais como o Quant-iT™ PicoGreen dsDNA Assay Kit (Cat. No. Q-33130) da Invitrogen. Para ambos os tipos de protocolo, recomendamos diluir o DNA purificado a uma proporção de 1:50 com solução TE e usar 5 µL na análise de quantificação.

Pelo método de absorção

Se preferir quantificar o DNA com absorção, recomendamos primeiro tratar a amostra purificada com RNase para digerir o RNA contaminante e remover os fragmentos de RNA com precipitação do DNA com etanol. Um protocolo detalhado é descrito em PD-PR-040, *RNA removal by double-RNase digestion*². O DNA de uma amostra oral normalmente contém consideravelmente mais RNA que a quantidade encontrada em amostras de sangue. Certifique-se de dissolver completamente o DNA precipitado em álcool antes de ler a absorção.

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

Os valores de absorção devem estar dentro da faixa linear do espectrofotômetro. Diluir e medir novamente as amostras que estiverem fora dessa faixa. Maiores informações constam em nossa documentação de instrumento.

Método:

1. Diluir uma fração de 10 μL de DNA purificado tratado com RNase em 90 μL de TE (diluição 1/10). Misturar movendo a pipeta para cima e para baixo. Esperar até que as bolhas desapareçam.
2. Usar TE na célula de referência (vazia).
3. Medir a absorção em 320 nm, 280 nm e 260 nm.
4. Calcular os valores corrigidos de A_{280} e A_{260} subtraindo a absorção em 320 nm (A_{320}) dos valores de A_{280} e A_{260} .
5. Concentração do DNA em ng/μL = A_{260} corrigido \times 10 (fator de diluição) \times 50 (fator de conversão).
6. Razão A_{260}/A_{280} : dividir A_{260} corrigido por A_{280} corrigido.

Exemplo

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

Tabela 2: Cálculo da força G a partir do raio e da velocidade do rotor

Para gerar uma força G mínima de $3,500 \times g$, é necessário solicitar velocidade de rotação (RPM) adequada ao tamanho do rotor. As combinações de velocidade de rotação e raio dos rotores que gerarão a força G mínima necessária estão destacadas veja abaixo.

Por exemplo, se o raio do rotor de sua centrífuga tiver 10 cm, será necessário selecionar velocidade de rotação mínima de 6,000 RPM. Lembre-se de que o mínimo exigido é de $3,500 \times g$. Centrifugue suas amostras na capacidade máxima da centrífuga, produzindo uma força que os tubos consigam suportar.

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												

Referências

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

Suporte técnico de segunda a sexta-feira, das 9h às 17h (horário da Europa Central):

- Ligações gratuitas (América do Norte): 1.866.813.6354, opção 6
- Todos os outros países: 613.723.5757, opção 6
- E-mail: support@dnagenotek.com

O Oragene*DNA e o ORAclect*DNA não estão à venda nos Estados Unidos.

O Oragene*DISCOVER destina-se exclusivamente ao uso em pesquisa e não está disponível para uso em procedimentos diagnósticos.

É possível que alguns produtos da DNA Genotek não estejam disponíveis em algumas regiões geográficas.

*Oragene, prepIT e ORAclect são marcas comerciais registradas da DNA Genotek Inc. Todas as demais marcas e todos os demais nomes mencionados neste documento são de propriedade de seus respectivos titulares.

Todos os protocolos, artigos científicos e notas sobre aplicações da DNA Genotek estão disponíveis na seção de Suporte de nosso site, em www.dnagenotek.com.

