

**Manual do protocolo
de purificação manual
para uso com**

prepIT™•L2P

DNAGENOTEK™

www.dnagenotek.com

Tel.: +1.613.723.5757
support@dnagenotek.com
sales@dnagenotek.com

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

*Amostras superiores
Desempenho comprovado*



O protocolo do prepIT™•L2P está disponível em outros idiomas em www.dnagenotek.com

Suporte técnico disponível de segunda a sexta (das 9h às 17h 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

Responsável no Reino Unido: Emergo Consulting (Reino Unido) Limited c/o Cr360 - UL International, Compass House, Vision Park Histon, Cambridge, CB24 9BZ

 Novosanis NV Bijkhoevelaan 32c,
2110 Wijnegem, Bélgica
E-mail: EUAR@novosanis.com

 Arazy Group Swiss GmbH
Bruderholzallee 53, 4059 Basel, Schweiz
E-mail: swiss.ar@arazygroup.com

Patrocinador australiano: Emergo Austrália, Level 20, Tower II, Darling Park, 201 Sussex Street, Sydney, NSW 2000 Austrália

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

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

Conteúdo

Uso previsto/finalidade	4
Estabilidade em uso	4
Características	4
Materiais	4
Avisos e precauções	4
Limitações de uso do produto	5
Transporte do prepIT•L2P	5
Armazenamento do prepIT•L2P (vida útil)	5
Descarte	5
Manutenção/reparos	5
Resumo das características de desempenho	5
Apresentações do produto	5
Garantias	6
Identificação e resolução de problemas	6
Protocolo laboratorial do prepIT para purificação manual de DNA a partir de:	
500 µL de amostra	7
Amostra integral	11
Quantificação de DNA	18

Uso previsto/finalidade

Purificação de DNA genômico a partir dos kits de coleta de saliva Oragene™ e ORAcollect™.

Estabilidade em uso

O PT-L2P-5 (5 mL) e o PT-L2P-45 (45 mL) têm 30 meses de estabilidade em uso à temperatura ambiente.

Características

- Propriedades químicas otimizadas para permitir a recuperação máxima de DNA de amostras orais coletadas com as linhas de produtos Oragene e ORAcollect.
- Uso comprovado no fornecimento de resultados consistentes com DNA de alto peso molecular.
- Método de purificação ajustável para volumes grandes ou pequenos de amostras.
- Fluxo de trabalho conveniente com suporte técnico completo desde a coleta até a extração.
- Método com boa relação custo-benefício, necessitando de uma quantidade mínima de equipamentos.

Materiais

- PT-L2P-5 (5 mL) e/ou PT-L2P-45 (45 mL)
- Manual do produto prepIT•L2P

Avisos e precauções

- Somente para uso laboratorial.
- NÃO ingerir o reagente líquido.
- NÃO use se a embalagem estiver danificada ou se o selo na tampa do funil estiver rompido ou com vazamento.
- NÃO use o prepIT•L2P após a data de validade (“Usar até”) indicada no frasco do reagente.
- Caso o reagente entre em contato com os olhos ou a pele, lave com água. NÃO ingerir.
- Comunique incidentes graves à DNA Genotek e às autoridades competentes em seu país.
- Consulte a FISPQ para obter instruções de descarte seguro do reagente não utilizado.
- A Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ) está disponível em 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 ambiente como um reagente laboratorial. Nenhum tipo de manuseio especial é requerido.

Armazenamento do prepIT•L2P (vida útil)

Armazenar à temperatura ambiente. A vida útil do PT-L2P-5 (5 mL) e do PT-L2P-45 (45 mL) deve ser de 30 meses, quando devidamente tampados e armazenados à temperatura ambiente.

Descarte

Kits não utilizados, danificados ou com vazamento devem ser descartados de acordo com os regulamentos locais, estaduais e federais adequados. Descartar como resíduo laboratorial.

Manutenção/reparos

Não aplicável. O prepIT•L2P é um reagente e não requer manutenção ou reparos.

Resumo das características de desempenho

O DNA genômico purificado com prepIT•L2P a partir dos kits de coleta de saliva Oragene™ e ORAcollect™ fornece DNA de alta qualidade e em alta quantidade, suficiente para uso em aplicações downstream, tais como PCR, microarrays e sequenciamento de nova geração.

Apresentações do produto

O prepIT•L2P está disponível em diversos volumes, dependendo das quantidades de preparações necessárias. Por exemplo:

Referência do produto / Número de catálogo	Volume de preparação da amostra	Quantidade de preparações
PT-L2P-5	0,5 mL	200
PT-L2P-45	0,5 mL	2.000

Garantias

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

Identificação e resolução de problemas

Entre em contato com o suporte técnico da DNA Genotek através do e-mail support@dnagenotek.com, ou ligue para +1 (613) 723-5757, opção 6.

Protocolo laboratorial do prepIT™ para purificação manual de DNA a partir de 500 µL de amostra

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

Reagentes incluídos

prepIT•L2P (Cat. n.º PT-L2P-5 ou PT-L2P-45)

Equipamentos e reagentes

- Microcentrífuga com capacidade de operar a 15.000 × g
- Microtubos de 1,5 mL (p. ex., Axygen® Cat. n.º MCT-150-C)
- Incubadora a ar ou água a 50 °C
- Etanol (95% a 100%) à temperatura ambiente
- Etanol (70%) à temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de DNA: Solução de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou semelhante

Procedimento

Etapas de purificação	Observações
1. Misture a amostra coletada com Oragene/ORACollect por inversão ou agitando gentilmente por alguns segundos.	• Isto tem a finalidade de garantir que amostras viscosas sejam devidamente misturadas.

Etapas de purificação	Observações
<p>2. Incube a amostra a 50 °C em uma incubadora a água por no mínimo 1 hora, ou em uma incubadora a ar por no mínimo 2 horas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Esta etapa de tratamento térmico é essencial para garantir que o DNA seja devidamente liberado e que as nucleases sejam permanentemente inativadas. • Esta etapa de incubação pode ser realizada a qualquer momento depois de a amostra ser coletada e antes de ser purificada. • A amostra integral deve ser incubada no tubo de coleta original antes da aliquotagem para garantir a homogeneidade da amostra. • A amostra pode ser incubada a 50 °C de um dia para o outro, se isso for mais conveniente. • Uma incubadora a ar requer um tempo mais longo, pois o equilíbrio térmico demora mais para ser atingido que em uma incubadora a água. <p>Observação: o uso de uma incubadora a ar pode ser preferível, uma vez que os tubos do Oragene/ORACollect podem flutuar em banho-maria. Se o uso de banho-maria for necessário, certifique-se de que a porção do tubo que contém a amostra permaneça imersa em água.</p>
<p>3. Transfira 500 µL da amostra misturada para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O restante da amostra pode ser armazenado à temperatura ambiente (15 °C a 25 °C) ou congelado. • Se desejado, a amostra pode ser armazenada congelada no tubo do Oragene/ORACollect a -20 °C, ou transferida para um tubo criogênico para armazenamento de longo prazo a -80 °C.
<p>4. Adicione 20 µL (1/25 do volume) de prepIT•L2P ao tubo da microcentrífuga e misture em vórtex por alguns segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A amostra ficará turva conforme as impurezas e inibidores se precipitarem.
<p>5. Incube em gelo por 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A incubação pode ser realizada à temperatura ambiente, mas será ligeiramente menos eficaz na remoção de impurezas.

Etapas de purificação	Observações
6. Centrifugue à temperatura ambiente por 5 minutos a 15.000 x g.	<ul style="list-style-type: none"> Um período mais longo de centrifugação (até 15 minutos) pode ser benéfico para reduzir a turbidez (A_{320} alto) da solução final de DNA.
7. Com uma ponta de pipeta, transfira cuidadosamente o sobrenadante transparente para um tubo de microcentrifuga limpo. Descarte o pellet contendo impurezas.	<ul style="list-style-type: none"> O pellet contém impurezas turvas. Se o tubo for acidentalmente perturbado, deverá ser centrifugado novamente.
8. Adicione 600 µL de etanol 95% a 100% à temperatura ambiente. Misture gentilmente por inversão 10 vezes.	<ul style="list-style-type: none"> Durante a mistura com etanol, o DNA será precipitado. A aparência poderá ser de um coágulo de fibras de DNA ou de um precipitado fino, dependendo da quantidade de DNA na amostra. Mesmo que nenhum coágulo seja visto, o DNA será recuperado seguindo-se cuidadosamente as próximas etapas.
9. Permita que a amostra descanse à temperatura ambiente por 10 minutos para permitir que o DNA precipite totalmente.	<ul style="list-style-type: none"> A incubação a -20 °C não é recomendada, pois impurezas podem se precipitar juntamente com o DNA.
10. Coloque o tubo na microcentrifuga em uma orientação conhecida. Centrifugue à temperatura ambiente por 2 minutos a 15.000 x g.	<ul style="list-style-type: none"> Por exemplo, posicione cada tubo na microcentrifuga com a parte articulada da tampa voltada para fora do centro do rotor. Após a centrifugação, a posição do pellet poderá ser localizada (mesmo que muito pequeno para ser visível); ele estará na ponta do tubo, abaixo da articulação.
11. Cuidadosamente, remova o sobrenadante com uma ponta de pipeta e descarte-o. Tome cuidado para não perturbar o pellet de DNA.	<ul style="list-style-type: none"> Esse pellet contém DNA. A perda do pellet resultará na perda do DNA. Girar o tubo de forma que o pellet fique na parede superior permitirá que você movimente uma ponta de pipeta com segurança ao longo da parede inferior e remova todo o sobrenadante. O sobrenadante pode conter impurezas e deve ser removido o mais completamente possível.

Etapas de purificação	Observações
<p>12. Lavagem com etanol: cuidadosamente, adicione 250 μL de etanol 70%. Deixe descansar à temperatura ambiente por 1 minuto.</p> <p>Remova completamente o etanol sem perturbar o pellet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É importante remover todo o etanol da amostra. O arraste de etanol pode afetar o desempenho do teste. • Após a remoção do etanol 70%, o tubo pode ser centrifugado de forma intermitente para permitir a remoção de etanol residual. • Tome cuidado para não perturbar o pellet de DNA; ele pode ser pequeno ou invisível. • Caso o pellet se solte, centrifugue a amostra por 5 minutos a $15.000 \times g$. • A secagem excessiva do pellet pode tornar o DNA mais difícil de dissolver.
<p>13. Adicione 100 μL de solução de TE (consulte a página 5) para dissolver o pellet de DNA. Misture em vórtex por, pelo menos, 5 segundos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se desejar uma concentração mais alta de DNA, utilize 50 μL de TE.
<p>14. Para garantir a reidratação completa do DNA, incube à temperatura ambiente de um dia para o outro e, em seguida, misture em vórtex, ou então, incube a 50 °C por 1 hora com mistura em vórtex ocasional.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • O processo de reidratação (dissolução) completa de grandes quantidades de DNA com alto peso molecular pode ser lento. • A reidratação incompleta do DNA é uma causa de imprecisão na estimativa da concentração de DNA e da possível falha em aplicações downstream, tais como PCR.
<p>15. Opções de armazenamento do DNA totalmente reidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> a) Em TE a -20 °C para armazenamento de longo prazo. Se desejar, divida em alíquotas. b) Em TE a 4 °C por até 2 meses. 	

Protocolo laboratorial de prepIT para purificação manual de DNA de amostra integral

Observação: para se obter os melhores resultados, este protocolo requer o uso de uma centrífuga (com rotor basculante ou de ângulo fixo) capaz de gerar pelo menos 3.500 x g.

O protocolo passo a passo a seguir descreve como purificar DNA de uma amostra completa (1 mL - 4 mL de volume total de amostra). Os volumes mostrados devem ser ajustados de acordo com o volume real coletado.

Reagentes incluídos

prepIT•L2P (Cat. n.º PT-L2P-5 ou PT-L2P-45)

Equipamentos e reagentes

- Centrífuga compatível com tubos de 15 mL, que seja capaz de gerar pelo menos 3.500 × g (consulte a Tabela 2).
- Tubos cônicos de polipropileno de 15 mL (p. ex., BD Falcon® Cat. n.º 352196)
- Microcentrífuga com capacidade de operar a 15.000 × g (opcional)
- Microtubos de 1,5 mL (p. ex., Axygen® Cat. n.º MCT-150-C)
- Incubadora a ar ou água a 50 °C
- Etanol (95% a 100%) à temperatura ambiente
- Etanol (70%) à temperatura ambiente
- Tampão de armazenamento de DNA: Solução de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) ou semelhante

Opcional: verificação pré purificação (apenas aplicável para amostras do Oragene; não é requerida para amostras do ORAcollect)

Pese a amostra para estimar a quantidade de saliva fornecida pelo doador (consulte a Tabela 1). A quantidade de saliva coletada é diretamente proporcional à quantidade de DNA recuperado. Por exemplo, se um doador forneceu menos de 2 mL de saliva, você deve esperar obter um rendimento total mais baixo dessa amostra.

Peso do kit (sem amostra)

Quando uma amostra chegar ao laboratório, sugerimos pesá-la para estimar se a quantidade correta de saliva foi fornecida pelo doador. Pode-se esperar alguma variabilidade entre doadores. O peso médio de um kit vazio é fornecido (Tabela 1). Para estimar a quantidade de amostra coletada (supondo-se 1 g/mL), realize o seguinte cálculo:

$$\frac{\text{Peso do kit que contém a amostra} - \text{Peso do kit sem amostra}}{\text{Quantidade de amostra coletada}}$$

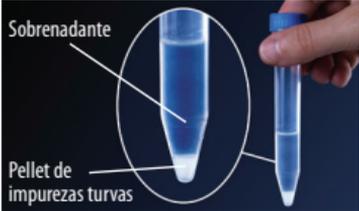
Tabela 1	
N.º do produto	Peso do kit sem amostra
OG-500/OGD-500/OGR-500	6,81 g
OG-510/OGD-510	5,83 g
OG-575/OGD-575/OGR-575	5,66 g
ON-500	6,47 g
ON-600	6,86 g
OG-600/OGD-600/OGR-600	7,26 g
OG-610/OGD-610	6,28 g
OG-675/OGD-675/OGR-675	6,00 g

Procedimento

Etapas de purificação	Observações
1. Misture a amostra coletada com Oragene/ORACollect por inversão ou agitando gentilmente por alguns segundos.	<ul style="list-style-type: none">• Isto tem a finalidade de garantir que amostras viscosas sejam devidamente misturadas.
2. Incube a amostra a 50 °C em uma incubadora a água por no mínimo 1 hora, ou em uma incubadora a ar por no mínimo 2 horas.	<ul style="list-style-type: none">• Esta etapa de tratamento térmico é essencial para maximizar o rendimento de DNA e assegurar que as nucleases sejam permanentemente inativadas.• A amostra pode ser incubada a 50 °C de um dia para o outro, se isso for mais conveniente.• Esta etapa de incubação pode ser realizada a qualquer momento depois de a amostra ser coletada e antes de o DNA ser purificado.• Uma incubadora a ar requer um tempo mais longo, pois o equilíbrio térmico demora mais para ser atingido que em uma incubadora a água. <p>Observação: o uso de uma incubadora a ar pode ser preferível, uma vez que os tubos do Oragene/ORACollect podem flutuar em banho-maria. Se o uso de banho-maria for necessário, certifique-se de que a porção do tubo que contém a amostra permaneça imersa em água.</p>
3. Transfira a amostra toda para um tubo de centrifuga de 15 mL (Figura 1). Observe o volume da amostra.	<ul style="list-style-type: none">• A transferência pode ser realizada vertendo-se ou pipetando-se com uma pipeta de vidro ou de plástico.



Figura 1: antes de prosseguir para a etapa 4, certifique-se de que a amostra integral foi incubada e transferida para um tubo de centrifuga limpo de 15 mL, conforme mostrado.

Etapas de purificação	Observações
<p>4. Adicione 1/25 do volume de prepIT•L2P e misture em vórtex por alguns segundos (Figura 2).</p>  <p><i>Figura 2: depois de adicionar o PT-L2P e incubar em gelo por 10 minutos, a amostra não mais terá uma aparência transparente, mas será uma solução turva.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • P. ex., para uma amostra de 4 mL, adicione 160 μL de prepIT•L2P. • A amostra ficará turva conforme as impurezas e inibidores se precipitam.
<p>5. Incube em gelo por 10 minutos.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A incubação pode ser realizada à temperatura ambiente, mas será menos eficaz na remoção de impurezas.
<p>6. Centrifugue à temperatura ambiente por 10 minutos, na velocidade mais alta possível. Mínimo de 3.500 \times g.</p>  <p><i>Figura 3: após a centrifugação, haverá um acúmulo de material turvo na base do tubo. O sobrenadante deverá ser visivelmente transparente.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Uma força centrífuga maior minimiza a quantidade de material turvo que será arrastado para o DNA purificado (Figura 3). Antes de prosseguir, confirme com o fabricante do tubo que os tubos de 15 mL para centrifuga conseguem suportar a força centrífuga. • Um período mais longo de centrifugação (até 20 minutos) pode ser benéfico para reduzir a turbidez (A_{320} alto) da solução final de DNA.
<p>7. Com uma pipeta, transfira cuidadosamente o sobrenadante transparente para um tubo de centrifuga limpo de 15 mL. Descarte o pellet.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Deixe um pequeno volume do sobrenadante para evitar perturbar o pellet. • O pellet contém impurezas turvas. Se o tubo for acidentalmente perturbado, deverá ser centrifugado novamente.

Etapas de purificação	Observações
<p>8. Acione 1,2x o volume de etanol 95% a 100% à temperatura ambiente ao sobrenadante transparente. Misture gentilmente por inversão 10 vezes.</p>  <p><i>Figura 4: após a adição de etanol, o DNA se precipitará, o que poderá resultar em um coágulo visível de fibras.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Durante a mistura com etanol, o DNA será precipitado. • O DNA precipitado poderá ter a aparência de um coágulo de fibras de DNA (Figura 4) ou de um precipitado fino, dependendo da quantidade de DNA na amostra.
<p>9. Deixe a amostra descansar à temperatura ambiente por 10 minutos para permitir que o DNA precipite totalmente.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A incubação a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ não é recomendada, pois impurezas podem se precipitar juntamente com o DNA.
<p>10. Centrifugue à temperatura ambiente por 10 minutos, na velocidade mais alta possível. Mínimo de $3.500 \times g$.</p>	
<p>11. Cuidadosamente, remova o sobrenadante com uma pipeta de vidro ou plástico e descarte-o. Tome cuidado para não perturbar o pellet de DNA.</p>  <p><i>Figura 5: usar uma ponta de pipeta para arranhá cuidadosamente a parte interna do tubo pode revelar a presença de uma película de DNA.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • O sobrenadante pode conter impurezas e deve ser removido o mais completamente possível. • O DNA precipitado será encontrado na forma de um pellet no fundo do tubo e, possivelmente, de uma película na lateral do tubo (Figura 5). • A película de DNA pode estar localizada na lateral do tubo que estiver voltada para fora do centro da centrifuga. • Uma película pode ser localizada por meio do teste do “arranhão”. Você pode verificar a presença de uma película de DNA arranhando a parte interna do tubo com uma ponta de pipeta. Uma película, conforme mostrado na Figura 5, poderá estar visível.

Etapas de purificação	Observações
<p>12. Lavagem com etanol: cuidadosamente, adicione 1 mL de etanol 70% ao tubo, sem perturbar a película ou o pellet. Deixe descansar à temperatura ambiente por 1 minuto. Agite levemente em movimentos circulares e remova completamente o etanol sem perturbar o pellet e ou a película.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • É importante remover todo o etanol da amostra. O arraste de etanol pode afetar o desempenho do teste. • Tome cuidado para não perturbar o pellet ou a película de DNA. • Uma centrifugação rápida (menos de 1 minuto) pode ser realizada para facilitar a remoção completa do sobrenadante. • Se o pellet se soltar após a etapa de lavagem com etanol, centrifugue a amostra por 5 minutos na velocidade mais alta possível. Mínimo de 3.500 × g.
<p>13. Para amostras de Oragene, reidrate o DNA adicionando 0,2 - 1,0 mL de solução de TE e misture a amostra em vórtex por 30 segundos.</p> <p>Para amostras de ORAcollect, reidrate o DNA adicionando 0,2 mL de solução de TE e misture a amostra em vórtex por 30 segundos.</p>  <p><i>Figura 6: misturar a amostra em vórtex por 30 segundos permitirá que você recupere a película de DNA da lateral do tubo. O DNA manterá o peso molecular alto.</i></p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se desejar uma concentração maior de DNA, reduza o volume de TE. Deve-se utilizar um mínimo de 200 µL de solução de TE. • A secagem excessiva do pellet (mais de 10 minutos) e o uso de menos de 500 µL de solução de TE podem dificultar a reidratação (dissolução) do DNA e diminuir o rendimento ou dificultar a quantificação. • O DNA precipitado será encontrado na forma de um pellet no fundo do tubo e, possivelmente, de uma película na lateral do tubo. • Para garantir a recuperação máxima de DNA, a amostra deve ser misturada em vórtex após a adição de solvente de DNA (solução de TE). Misturar em vórtex garantirá que a película de DNA na lateral do tubo seja recuperada (Figura 6). • Misturar em vórtex não romperá o DNA.
<p>14. Para garantir a reidratação completa do DNA, incube à temperatura ambiente de um dia para o outro e, em seguida, misture em vórtex, ou então, incube a 50 °C por 1 hora com mistura em vórtex ocasional.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • A reidratação incompleta do DNA é uma causa de imprecisão na estimativa da concentração de DNA e da possível falha em aplicações downstream, tais como PCR.

Etapas de purificação	Observações
<p>15. Transfira o DNA reidratado para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL para armazenamento.</p>	
<p>Etapa opcional:</p> <ol style="list-style-type: none"> Centrifugue o DNA reidratado à temperatura ambiente por 15 minutos a 15.000 x g. Transfira o sobrenadante para um tubo de microcentrifuga limpo de 1,5 mL sem perturbar o pellet. 	<p>Observe que o pellet contém material turvo insolúvel.</p> <ul style="list-style-type: none"> Para maximizar a recuperação de DNA, certifique-se de que o DNA foi totalmente reidratado (etapa 14) antes de realizar esta etapa de centrifugação. Esta etapa de centrifugação garante que todo o material turvo restante seja removido da amostra de DNA. Deve-se tomar cuidado para não perturbar o pellet durante a transferência do sobrenadante transparente para um tubo limpo.
<p>16. Opções de armazenamento do DNA totalmente reidratado:</p> <ol style="list-style-type: none"> Em TE a -20 °C para armazenamento de longo prazo. Se desejar, divida em alíquotas. Em TE a 4 °C por até 2 meses. 	<ul style="list-style-type: none"> O congelamento de DNA purificado em TE pode fazer com que o DNA se precipite. Quando descongelar DNA purificado congelado, preste muita atenção à reidratação, conforme discutido na etapa 14.

Quantificação do DNA

Por método de fluorescência

Ensaios que utilizam corantes fluorescentes são mais específicos que aqueles que utilizam absorvância a 260 nm para quantificar a quantidade de DNA de fita dupla (dsDNA) em uma amostra de DNA. Sugerimos o uso de kits disponíveis comercialmente, tais como o Kit de Ensaio Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA (Thermo Fisher Scientific) ou o QuantiFluor® dsDNA System (Promega). Pode ser necessário diluir o DNA a até 1:50 em TE antes que este possa ser utilizado no ensaio de quantificação.

Por método de absorvância

Se você optar por quantificar o DNA por absorvância, recomendamos primeiro tratar a amostra purificada com RNase para digerir o RNA contaminante e, em seguida, remover os fragmentos de RNA por precipitação do DNA em etanol. Um protocolo detalhado está descrito no PD-PR-040, *Remoção de RNA por digestão com RNase dupla*.¹ Observe que o DNA de uma amostra oral costuma conter consideravelmente mais RNA do que aquele encontrado em amostras de sangue. Certifique-se de que o DNA precipitado em álcool está totalmente dissolvido antes de preparar 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 DNA de fita dupla puro.

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

Referências

- ¹ Remoção de RNA por digestão com RNase dupla. PD-PR-040. DNA Genotek.

Método

1. Dilua uma alíquota de 10 µl de DNA purificado tratado com RNase em 90 µl de TE (diluição 1/10). Misture gentilmente, pipetando para cima e para baixo. Aguarde até as bolhas desaparecerem.
2. Use TE na célula (branco) de referência.
3. Meça a absorbância a 320 nm, 280 nm e 260 nm.
4. Calcule os valores corrigidos de A_{280} e A_{260} subtraindo a absorbância a 320 nm (A_{320}) dos valores de A_{280} e A_{260} .
5. A concentração de DNA em ng/µL = A_{260} corrigido x 10 (fator de diluição) x 50 (fator de conversão).
6. Razão A_{260}/A_{280} : divida o A_{260} corrigido pelo A_{280} corrigido.

Exemplo

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

O Oragene•DNA e o ORAcollect•DNA não se encontram disponíveis para venda nos Estados Unidos.

O Oragene•DISCOVER se destina somente ao uso em pesquisas, e não em procedimentos de diagnóstico.

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

Oragene, prepIT, ORAcollect e DNA Genotek são marcas comerciais da DNA Genotek Inc. Todas as demais marcas ou nomes mencionados neste documento pertencem aos seus respectivos proprietários.

Todos os protocolos, informes técnicos e notas de aplicação da DNA Genotek estão disponíveis na seção de suporte do nosso site em www.dnagenotek.com.

Legenda do rótulo:

	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Número de catálogo
	Marcação CE
	Fabricante
	Consulte o folheto de instruções
	Representante autorizado na Europa
	Representante autorizado na Suíça
	Número do lote
	Identificador único de dispositivo
	Estabilidade em uso
15 °C / 30 °C 59 °F / 86 °F	Instruções de armazenamento

Patente (www.dnagenotek.com/legalnotices)