

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 04 Versão: 04 Página 1

EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE TOTAL

- ✓ 10 mL de sangue periférico coletado em tubo com EDTA e armazenado a 4°C até no máximo 10 dias.
- ✓ Checar se há todas as soluções necessárias e se estão viáveis para uso
- ✓ Ligar a máquina de gelo

Solução de Bloodlyse 10X (500mL)

- Pesar:
 - 41,455g NH₄Cl
 - 5,005g KHCO₃
 - 1,8612g EDTA
- Acrescentar 200 mL de água Milli-Q e ajustar o pH para 7,4.
- Completar para 500 mL.
- **Diluir para uso na hemólise para 1x.**

Solução de Nucleolyse 10X (500mL)

- Pesar 23,88g NaCl
- 10 mL Tris-HCl 1M
- 10 mL EDTA 0,2M pH 8.0
- Acrescentar 200 mL de água Milli-Q e ajustar o pH para 8,2.
- Completar para 500 mL.
- **Diluir para uso na hemólise para 1x.**

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 04

Versão: 04

Página 2

1º. Dia

Hemólise

1. Transferir o sangue total para um tubo falcon de 50 mL.
2. Lavar bem os tubos de EDTA contendo o sangue com a solução de bloodyse 1X e transferir para o tubo falcon até completar o volume de 50 mL.
3. Agitar fortemente.
4. Deixar os tubos falcons 4°C (gelo) por 30 minutos.
5. Retirar a proteinase K do freezer -20°C e deixar descongelar no gelo.
6. Após a incubação, centrifugá-los a temperatura ambiente por 15 minutos a 1.800 r.p.m.
7. Durante a centrifugação, se formará um precipitado branco (“pellet”), contendo os leucócitos ou células brancas. Este pellet deve ser preservado e o sobrenadante deve ser descartado.

Lavagem

8. Lavar bem o tubo falcon e, conseqüentemente o pellet, tomando o cuidado de não desprenhê-lo do fundo do tubo e perdê-lo.
9. Adicionar mais 10 mL de bloodyse 1X.
10. Ressuspender o sedimento leucocitário através de forte agitação.
11. Centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos a 1.800 r.p.m.

Lise

12. Descartar o sobrenadante.
13. Ressuspender o sedimento leucocitário em 3 mL de solução de nucleolyse 1X através de forte agitação.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Revisado por: Carolina Graziani Vital

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 04

Versão: 04

Página 3

14. Adicionar 300 µL de SDS 10% e 50 µL de proteinase K (10mg/mL, deve estar totalmente descongelada).

15. Agitar fortemente toda a mistura (formará espuma por causa do SDS)

16. Incubar overnight a 37°C.

2º Dia

Precipitação

1. Adicionar 1 mL de solução de NaCl 6 M.
2. Misturar vigorosamente até ficar com um aspecto leitoso.
3. Centrifugar a temperatura ambiente por 20 minutos a 2.500 r.p.m.
4. Ajustar o banho seco para 65°C e colocar o frasco de etanol absoluto, em uso, na geladeira.
5. Separar novos tubos falcons de 50 mL e microtubos de 1,5 mL e identificá-los.
6. Transferir o "sobrenadante" para um novo tubo falcon de 50 mL tomando o cuidado para o precipitado não cair junto (resto de proteínas).
7. Centrifugar novamente a temperatura ambiente por mais 15 minutos a 2.500 r.p.m.
8. Pegar vials de vidro, etanol absoluto gelado e etanol 70%.
9. Após a centrifugação, passar o sobrenadante para o vial de vidro e adicionar etanol 100% gelado.
10. Esperar até o DNA subir à superfície do vial de vidro.
11. "Pescar" o DNA com capilar e tirar o excesso de etanol.
12. Transferir para o microtubo de 1,5 mL previamente identificado e quebrar a outra extremidade do capilar para caber dentro do microtubo.
13. Adicionar 1 mL de etanol 70%.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão

Revisado por: Carolina Graziani Vital



MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR



Data: 01/07/2018

Próxima revisão:

01/07/2019

LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES

Nº: 04

Versão: 04

Página 4

14. Centrifugar a 4°C por 10 minutos a 13.000 r.p.m.
15. Descartar o sobrenadante invertendo o microtubo.
16. Deixar secar bem o tubo, de preferência dentro de um fluxo laminar, evitando contaminação das amostras.
17. Depois de completamente sem resíduo de etanol, ressuspender o DNA em TE (o volume vai depender do tamanho do pellet).
18. Aquecer as amostras (DNA) a 65°C por 30 minutos no banho seco.
19. Retirar do banho, homogenizar, deixar na bancada para esfriar e armazenar a 4°C em caixa apropriada.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho

Revisado por: Carolina Graziani Vital

Aprovado por:

Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão