

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 09
Próxima revisão:		Versão: 04
01/07/2019		Página 1

TRATAMENTO DNase/RNase-FREE COM DEPC

Preparo de material livre de RNase

As ribonucleases são de difícil controle. O único método possível é evitar a sua presença nos reagentes, vidrarias e materiais, evitando a subsequente contaminação. Durante a manipulação das amostras e soluções, deve-se sempre usar luvas de látex descartáveis. Devem ser usadas boas práticas de microbiologia.

Os materiais plásticos devem ser descartáveis e pipetadores automáticos devem ser dedicados a manipulação de RNA para evitar contaminação cruzada com RNases (empregadas no isolamento de DNA). Os cadinhos e pistilos devem ser lavados com uma solução de 0,01 % SDS (p/v), e enxaguados com água, água destilada e água ultrapura (Milli-Q). A seguir, os cadinhos e pistilos são incubados com água tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) ativo por duas horas na capela e secos, antes de serem embalados com papel alumínio, autoclavados (120°C) por 20 minutos e secos na estufa (80°C). Todas as soluções usadas para trabalhos com RNA devem ser preparadas com água 0,01% DEPC autoclavada. As cubas de eletroforese e pentes para RNA devem ser lavadas com 0,01% SDS, enxaguar bem e deixar secar com solução de etanol 70%. Em seguida, deixar a TA com solução de H₂O₂ 3% por 10 minutos. Enxaguar com água DEPC 0,01%. A vidraria também é lavada da mesma forma e depois autoclavada.

Na presença de TRIZOL o RNA está protegido contra ribonucleases. Após a precipitação e lavagem, é recomendável que os tubos e plásticos

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	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 09
Próxima revisão:		Versão: 04
01/07/2019		Página 2

estejam livres de RNase para evitar a degradação. Uma outra possibilidade de tratamento das vidrarias pode ser a 150°C por 4 h e os itens plásticos tratados por 10 minutos com solução de NaOH 0,5M, lavados completamente com água e autoclavados.

O DEPC deve ser manuseado com cuidado. O DEPC é um detergente EXTREMAMENTE TÓXICO, INFLAMÁVEL E MUTAGÊNICO. Manipulá-lo somente com luvas e máscara. Executar todo o procedimento na capela.

Na capela:

- Preparar toda a vidraria necessária, incluindo a água Milli-Q e DEPC (Dimetil pirocarbonato)
- Diluir o DEPC em água ultra pura – 1:1000
- Homogeneizar muito bem, cuidando para não fazer um excesso de espuma
- Deixar o material a ser tratado completamente de molho por 20 a 60 minutos a temperatura ambiente (o DEPC é volátil)
- Em seguida, escorrer bem o excesso da solução e autoclavar o material.

Tratamento de soluções (na capela):

- Diluir o DEPC 1:1000 diretamente na solução (Ex: para 499,5ml de água adicionar 0,5ml de DEPC)
- Homogeneizar muito bem, cuidando para não fazer um excesso de espuma
- Deixar a solução dentro do frasco semi-aberto por 20 a 60 minutos a temperatura ambiente (o DEPC é volátil)
- Em seguida, autoclavar a solução.

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: 09
		Versão: 04
		Página 3

Importante:

- 1) A vida média do DEPC é de 30 minutos
- 2) Após a autoclavação o DEPC é hidrolisado a Etanol e CO₂
- 3) Não utilizar DEPC com TRIS e HEPES, pois inibem a atuação do DEPC.

Como o DEPC reage com aminas, não pode ser usado para tratar soluções contendo tampão Tris, nem no tratamento de solventes orgânicos. Deve-se obrigatoriamente separar um frasco de reagente para o preparo exclusivo de soluções a serem utilizadas para a extração de RNA.

Laboratório de Metabolismo e Lípidos

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