

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 020</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/4
<b>Assunto:</b> 'Separação de Micropartículas (Arquéias) Soro e Plasma Preparo de Meio H/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

## \*ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ABRANGÊNCIA
3. RESPONSABILIDADES
4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES
5. DEFINIÇÕES
6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS
7. FLUXOGRAMAS
8. ANEXOS
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

<i>Edição</i>	<i>Alteração</i>
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 034; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por: <b>Suely Aparecida Pinheiro Palomino</b> <b>Joyce Kawakami</b>  Biologistas	27/07/2015	Aprovado por:  <b>Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi</b> Pesquisadora	15/03/21
--	------------	--	----------

## 1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos, Soro e Plasma , e Reagentes utilizados no processo de separação de Micropartículas.

## 2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

## 3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem o procedimento de separação de Micropartículas

## 4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável

## 5. DEFINIÇÕES

- 5.1 Estudo das micropartículas( Arquéias), foi realizado no soro e plasma , utilizando o protocolo modificado,de Ernesto Bustamante et al. visualizados pelo Microscópio Eletrônico

## 6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

### 6.1 .Preparação do material

- 6.1.1 Tabela 01 - Meio H - 200mM D-Manitol, 70mM Sucrose, 2mM HEPES, 0,5g/L BSA pH 7,2.

Ajustar o pH para 7,2 e depois colocar o BSA, não mexer dissolve sozinho. Validade 1 semana na geladeira	
Nome	Quantidade
D manitol 20%	9,1 ml
sucrose	1,195 g
Hepes	0,0238
Água de injeção qsp	50 ml
BSA	0,025g

- 6.1.2 O tubo sem anticoagulante de sangue (Soro), deverá ficar incubado a 37°C, a 1 hora, para que ocorra a retração do coágulo e o tubo com anticoagulante de sangue ( Plasma) fica dentro do Fluxo Laminar

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 020</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/4
<b>Assunto:</b> 'Separação de Micropartículas (Arquéias) Soro e Plasma Preparo de Meio H/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.1.3 Identificar 5 microtubos de 500µl para soro e 5 micro Microtubos de 500µl para plasma da seguinte maneira:

N° Pesquisa/caso Soro total Data __/__/__	N° Pesquisa/caso Plasma total Data __/__/__
---	--

6.1.4 Após a incubação, os tubos soro e plasma serão pesados na balança analítica (n°30) e separados em par para a calibração da centrifuga (n°60). A seguir serão centrifugados por 10 minutos a 2.000rpm.

6.1.5 As amostras serão aliquotadas em 5 microtubos contendo 400µl cada e armazenadas no freezer -20°C para amostras biológicas, na prateleira e caixa designadas para a pesquisa em questão.

**6.2 Separação das frações pellet e sobrenadante.**

6.2.1 Pegar uma amostra soro total contendo 400µl, separar em dois Microtubos de 1,5ml contendo 200µl cada e adicionar 1000µl de meio H. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora.

6.2.2 Após a incubação, os microtubos serão centrifugados na centrifuga refrigerada (n°36) -rotor 11462 – programa 1 - 12 minutos – 9500g -temperatura ambiente).

6.2.3 Durante a centrifugação identificar os microtubos , identificar 10 microtubos de 500µl e 1 microtubo de 2000µl para sobrenadante soro, 10 Microtubos de 500µl para pellet soro, 10 microtubos de 500µl e 1 microtubo de 2000µl para sobrenadante plasma e 10 Microtubos de 500µl para pellet plasma da seguinte maneira:

N° Pesquisa/caso Meio H - soro Sobrenadante Data __/__/__	N° Pesquisa/caso Meio H - soro pellet Data __/__/__	N° Pesquisa/caso Meio H - plasma Sobrenadante Data __/__/__	N° Pesquisa/caso Meio H - plasma Sobrenadante Data __/__/__
---	---	---	---

6.2.4 Após a centrifugação os microtubos são levados ao Fluxo Laminar.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 020</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/4
<b>Assunto:</b> 'Separação de Micropartículas (Arquéias) Soro e Plasma Preparo de Meio H/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.2.4.1 **SORO PELLET:** Adicionar 600µl de meio H aos 400µl restantes de cada microtubo de onde se retirou os 1000µl do sobrenadante. Homogeneizar e aliquotar 400µl em cada microtubo identificado.

#### 6.2.4.2 **PLASMA**

6.2.4.2.1 **SOBRENADANTE:** Aspirar 1000µl de cada microtubo plasma e adicionar ao microtubo de 2000µl. A partir do microtubo de 2000µl, aliquotar 400µl em cada microtubo identificado.

6.2.4.2.2 **PELLET:** Adicionar 600µl de meio H aos 400µl restantes de cada microtubo de onde se retirou os 1000µl do sobrenadante. Homogeneizar e aliquotar 400µl em cada microtubo identificado.

As amostras aliquotadas contendo 400µl cada, serão armazenadas no freezer -20°C para amostras biológicas, na prateleira e caixa designadas para a pesquisa em questão.

#### 6.3 **LIMPEZA :**

6.3.1 O local, deverá ser limpo antes e após o uso com gazes embebidas com Álcool 70°C , descartar o material usado

#### 6.4 **EPIs:**

6.4.1 Luvas nitrílicas, avental.

#### 6.5 **EPC:**

6.5.1 Fluxo laminar .

### 7. **FLUXOGRAMAS**

7.1 Não aplicável

### 8. **ANEXOS**

8.1 Não aplicável

### 9. **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

9.1 Protocolo descrito por Ernesto Bustamante, Peter Pedecutakis, Lehua H.E, John J Lemasters. Journal: Biochemical and Biophysical Research Communications 334 (2005) 907 – 910 Isolated mouse liver mitochondria are devoid of glucokinase..