

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 030
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
Assunto: Extração DNA/RNA – Fragmento congelado- Fenol Clorofórmio e PureLink Viral RNA/DNA kit - Invitrogen 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

Edição	Alteração
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 056 com data de vigência de 27/07/2015.</i>

031

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

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 030
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
Assunto: Extração DNA/RNA – Fragmento congelado- Fenol Clorofórmio e PureLink Viral RNA/DNA kit - Invitrogen Limpeza do local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para a Técnica de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) através da Eletroforese em material congelado.

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem, a Técnica de Ácidos Nucleicos (DNA/RNA) através da Eletroforese.

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. O princípio é baseado no fato da molécula de DNA possuir carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e consequentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (ânodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz. Utiliza-se normalmente o gel de agarose para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1 kb = 1000 pares de bases). O gel de agarose é feito apenas através da mistura de um tampão e agarose, a eletroforese em gel de agarose pode ser usada como método analítico ou preparativo, isto é, quando o fragmento de DNA é recuperado e purificado a partir do gel.

Frequentemente se utiliza a coloração com brometo de etídio (EtBr), uma substância mutagênica. Em adição, para a visualização do DNA corado com EtBr, é necessária a utilização de transiluminador de luz ultravioleta. Para a utilização de tal aparelho e para o uso do brometo de etídio, é necessário o cuidado com a biossegurança não somente do manipulador, mas de todos os que compartilham o uso do laboratório.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 030
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
Assunto: Extração DNA/RNA – Fragmento congelado- Fenol Clorofórmio e PureLink Viral RNA/DNA kit - Invitrogen Limpeza do local		Vigência: 08/03/2021

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

6.1 Extração de RNA e DNA de Material Congelado:

Os fragmentos de biopsias foram colhidos em vial de congelamento contendo 1ml de RNAlater (Ambion – cat nº AM7021), o frasco ficou na geladeira por aproximadamente 3 dias antes de serem estocados em nitrogênio líquido.

6.1.1 Lise Celular:

As amostras com mais de 0,5mm foram maceradas em cadinho e colocadas em eppendorf a seguir, foram adicionados

6.1.2 1000µl de tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, SDS e Triton X-100 na concentração final de 0.8% e 0.06% respectivamente + 20µl de proteinase K 20mg/ml) e a amostra foi incubada a 60°C por ± 24 horas. Após 16 horas, as amostras que não estavam totalmente digeridas foram adicionados 20µl de Proteinase K 10mg/ml. Após a incubação, o material foi centrifugados por 1 minuto por 13.000rpm, e o sobrenadante recolhido em dois eppendorfs, um foi usado para a extração de DNA com Fenol Clorofórmio e o outro para extração de DNA/RNA com PureLink Viral RNA/DNA kit – Invitrogen – cat 12280-050.

6.2 Tampão de Lise Celular (modificado)

Com Fenol Clorofórmio Extraído do artigo: AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*. Marcus Bettstetter, XuPeng, Roger^a Garrett, David Prangshvili.

6.2.1 Após a incubação, centrifugar 2000g por 10 minutos (remoção dos debris celulares), adicionar o mesmo volume do sobrenadante de fenol tamponado, centrifugar 10000rpm por 5 minutos, recolher o sobrenadante e adicionar o mesmo volume de solução de fenol/cloroformio/isoamilico.

6.2.2 Homogeneizar gentilmente e centrifugar 10000rpm por 5 minutos. Recolher o sobrenadante e adicionar o mesmo volume de solução de fenol/cloroformio/isoamilico.

6.2.3 Homogeneizar gentilmente e centrifugar 10000rpm por 5 minutos. Recolher o sobrenadante e adicionar 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH8.0 e 2 volumes de etanol absoluto.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 030
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
Assunto: Extração DNA/RNA – Fragmento congelado- Fenol Clorofórmio e PureLink Viral RNA/DNA kit - Invitrogen Limpeza do local		Vigência: 08/03/2021

6.2.4 Incubar 24 horas a -20°C . Centrifugar a 13000g por 30 minutos a 4°C . Desprezar o sobrenadante. Deixar os eppendorfs secando a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. Ressuspender com 50µl de água de injeção.

6.3 **Extração DNA - PureLink Viral RNA/DNA kit - Invitrogen**

6.3.1 Adicionar 200µl de lysis buffer contendo 5.6µg de Carrier RNA (preparo da solução pag 6 – user manual) e incubar a 56°C por 15 minutos. A seguir foram adicionados 250µl de etanol absoluto e misturados no vortex por 15 segundos.

6.3.2 Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Os lisados foram adicionados as colunas (Viral Spin Colum) e estas colocadas dentro de tubos coletores. O material foi centrifugado por 1 minuto a 6.800g, o tubo coletor foi descartado e as colunas foram colocadas em tubos coletores novos.

6.3.3 Foram adicionadas as colunas 500µl de Wash Buffer com etanol, os tubos contendo as colunas foram centrifugados a 1 minuto a 6.800g, o líquido centrifugado foi descartado. As colunas foram novamente lavadas com 500µl de Wash Buffer com etanol os tubos contendo as colunas foram centrifugados a 1 minuto a 6.800g, o líquido centrifugado foi descartado.

6.3.4 As colunas foram novamente centrifugadas a 1 minuto na velocidade máxima para remover resíduos de Wash Buffer. As colunas foram colocadas em tubos de 1,7ml. Foram adicionados 30µl de água Rnasefree no centro da coluna (eluição).

6.3.5 As colunas foram incubadas por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugadas por 1 minuto na rotação máxima. As colunas foram descartadas e as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro e armazenadas a -20°C .

6.4 **Quantificação DNA/RNA**

6.4.1 Após a extração, as amostras de DNA/RNA foram submetidas a análise de sua concentração e pureza determinadas através da leitura de absorbância em 260nm (UV - Concentração do DNA em $\text{mg/ml} = \text{Abs} \times 100 \times 50 \mu\text{g/ml}$) e em 280nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro (NanoDrop ThermoScientific 2000). Os valores foram expressos em µg/µl.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 030
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/5
Assunto: Extração DNA/RNA – Fragmento congelado- Fenol Clorofórmio e PureLink Viral RNA/DNA kit - Invitrogen Limpeza do local		Vigência: 08/03/2021

Nº	Identificação da amostra	RNA		DNA	
		260/280	ng/µl	260/280	ng/µl
1					
2					
3					
4					
5					
6					

- 6.5 **Limpeza:** Após o uso limpar com uma gaze com álcool 70°C, o local e guardar o material utilizado. Conservar o local limpo e organizado

7. FLUXOGRAMAS

- 7.1 Não aplicável.

8. ANEXOS

- 8.1 Não aplicável.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 9.2 A Análise de DNA por Eletroforese. Autores: Elisete Marcia Corrêa e Patrícia Abrão Possik.