

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 031
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/5
Assunto: Extração e Purificação de DNA/RNA Fragmento fixado em Formol/ 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 057; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

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 031
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/5
Assunto: Extração e Purificação de DNA/RNA Fragmento fixado em Formol/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para a Técnica de Extração e Purificação de DNA/RNA através de fragmento fixado em Formol.

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..

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

6.1 Lise Celular:

As amostras foram separadas em dois eppendorfs contendo um fragmento em cada tubo.

- 6.1.1 Foram adicionados 500µl 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 as amostras foram incubadas a 60°C por ± 24 horas. Após a

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 031
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/5
Assunto: Extração e Purificação de DNA/RNA Fragmento fixado em Formol/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

incubação, seguimos dois protocolos de extração de DNA (1) extração de DNA com Fenol clorofórmio e (2) extração de DNA e RNA com Purelink viral RNA/DNA mini kit – cat. 12280-050 .

- 6.1.2 **Tampão de Lise Celular (com modificações)** Extraído do artigo: AFV1, a novel virus infecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*. Marcus Bettstetter, XuPeng, Roger^a Garrett, David Prangshvili.

6.2 **Extração com Fenol Clorofórmio**

- 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. Incubar 24 horas a –20°C.
- 6.2.4 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 e incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Os lisados foram adicionados as colunas (Viral Spin Column) e estas colocadas dentro de tubos coletores.
- 6.3.2 O material foi centrifugado por 1 minuto a 6.800g, o tubo coletor foi descartado e as colunas foram colocadas em tubos coletores novos. Foram adicionadas as colunas 500µl de Wash Buffer com etanol, os tubos contendo as colunas foram centrifugados a 1 minuto a 6.800g, o liquido centrifugado foi descartado.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 031
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/5
Assunto: Extração e Purificação de DNA/RNA Fragmento fixado em Formol/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.3.3 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. As colunas foram novamente centrifugadas a 1 minuto na velocidade máxima para remover resíduos de Wash Buffer.

6.3.4 As colunas foram colocadas em tubos de 1,7ml. Foram adicionados 30µl de água Rnasefree no centro da coluna (eluição). 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 mg/ml=Absx100x50µg/ml) e em 280nm (quantificação de proteínas) no espectrofotômetro (NanoDropThermoScientific 2000). Os valores foram expressos em µg/µl.. Tabela 01

Tabela 01 - Quantificação DNA

Nº	Amostra	DNA		RNA		OBSERVAÇÕES
		260/280	ng/µl	260/280	ng/µl	
1	1.					
2	2.					
3	3.					

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

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 031
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/5
Assunto: Extração e Purificação de DNA/RNA Fragmento fixado em Formol/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

7. FLUXOGRAMAS

7.1 Não aplicável.

8. ANEXOS

8.1 Não aplicável.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

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