

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 032
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/6
Assunto: Extração de DNA Fragmento Fixado em Formol e Parafinado/ 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 058; 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 032
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/6
Assunto: Extração de DNA Fragmento Fixado em Formol e Parafinado/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para a Técnica de Extração e Purificação de DNA através de fragmento fixado em formol e parafinado

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 Material Parafinado .

- 6.1.1 O DNA foi extraído a partir de amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo convencional Leica, a partir de cada bloco foram obtidos cortes histológicos com 5µm de espessura. Para cada bloco foi utilizada uma navalha nova, afim de que não houvesse contaminação entre as amostras e coletados em microtubosautoclavados. Antes dos cortes, as bancadas e os instrumentos foram

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 032
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/6
Assunto: Extração de DNA Fragmento Fixado em Formol e Parafinado/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

borrifados com solução RNase Way (Invitrogen). Todo o procedimento foi feito com luvas descartáveis e todas as ponteiras e microtubos foram autoclavados e eram livres de DNase e RNase.

6.1.2 Desparafinização

- 6.1.2.1 Material embebido em parafina 3 cortes de 5µm, adicionar 1 ml de xilol (agitar gentilmente) incubar 30 minutos a 65°C, centrifugar 14000rpm por 5 minutos
- 6.1.2.2 Descartar o sobrenadante (descarte de solvente orgânico), adicionar 1ml de etanol absoluto (agitar). Incubar 1 minutos a temperatura ambiente
- 6.1.2.3 Centrifugar 14000rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante. Adicionar 1ml de etanol 95% (agitar gentilmente). Incubar 1 minuto
- 6.1.2.4 Centrifugar 14000rpm por 5 minutos, descartar o sobrenadante. descartar o sobrenadante

6.2 Lise Celular (com modificações)

Extraído do artigo: AFV1, a novel virusinfecting hyperthermophilic archaea of the genus *Acidianus*. Marcus Bettstetter, Xu Peng, Roger^a Garrett, David Prangshvili

- 6.2.1 Foram adicionados 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 dividido em 2. Uma parte foi separada para extração com Kit PureLink Invitrogen e outra parte o DNA foi extraído com Fenol/Clorofórmio

6.3 Extração com Fenol Clorofórmio

- 6.3.1 Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos (remoção dos debris celulares), os sobrenadantes foram transferidos para outros eppendorfs; adicionado o mesmo volume do sobrenadante de fenol tamponado, as amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 10000rpm por 5 minutos;

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 032
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/6
Assunto: Extração de DNA Fragmento Fixado em Formol e Parafinado/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

o sobrenadante foi recolhido e adicionado o mesmo volume de solução de fenol/cloroformio/isoamílico, as amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 10000rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi novamente recolhido e adicionado o mesmo volume de solução de fenol/cloroformio/isoamílico, as amostras foram homogeneizadas por inversão e centrifugadas a 10000rpm por 5 minutos; o sobrenadante foi recolhido e adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH8.0 e 2 volumes de etanol absoluto, as amostras foram homogeneizadas por inversão e incubadas 24 horas a -20°C para a precipitação do DNA;

6.3.2 As amostras foram centrifugadas a 13000g por 30 minutos a 4°C ; os sobrenadantes foram desprezados e os eppendorfs ficaram secando a temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos;

6.3.3 As amostras foram ressuspensas com 50 μl de água de injeção e quantificadas em espectrofotometro. (**Hidratação do DNA:** pellet foi ressuspensado em 50 μl de água de injeção, a seguir, o material foi incubado a 65°C em banho seco ou banho Maria por 30 minutos - **Degradação da Proteinase K:** A inativação da Proteinase K deve ser feita antes do PCR. Incubar o DNA 5 minutos a 95°C .)

6.4 **Extração DNA - PureLink Viral RNA/DNA kit –Invitrogen – cat 12280-050**

6.4.1 Adicionar 200 μl de lysis buffer contendo 5.6 μg de Carrier RNA (preparo da solução pag 6 – user manual) e incubar a 56°C por 15 minutos, a seguir foram adicionados 250 μl de etanol absoluto e misturados no vortex por 15 segundos. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 5 minutos.

6.4.2 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. Foram adicionadas as colunas 500 μl de Wash Buffer com etanol, os tubos contendo as colunas foram centrifugados a 1 minuto a 6.800g, o liquido centrifugado foi descartado.

6.4.3 As colunas foram novamente lavadas com 500 μl 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 032
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/6
Assunto: Extração de DNA Fragmento Fixado em Formol e Parafinado/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.4.4 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).

6.4.5 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 espectrofotometro e armazenadas a -20°C

6.5 Quantificação DNA/RNA

6.5.1 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	
		260/280	ng/µl	260/280	ng/µl
1	1.				
2	2.				
3	3.				

OBSERVAÇÕES

6.6 **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.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 032
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 6/6
Assunto: Extração de DNA Fragmento Fixado em Formol e Parafinado/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

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