


Procedimento Operacional Padrão_ Extração de DNA

Assunto: EXTRAÇÃO DE DNA HUMANO_GENOTIPAGEM		
Substitui: -		POP 14
Data de Operacionalização:		Nº de Páginas: 05
Distribuição: Todos os envolvidos capacitados ou treinados (docentes, pesquisadores, alunos de graduação ou pós-graduação) para realização da extração de DNA de sangue periférico ou sangue em papel filtro para genotipagem.		
Elaborado por: Mileny Esbravatti Stephano Colovati		Data: 17/12/2020
Revisado por: Danielle Cristine Ginsicke		Data: 17/12/2020
Aprovado por: Angelina Zanesco		Data: 17/12/2020
Obsoleto em: ___/___/___ Motivo:		

1. OBJETIVO

Estabelecer critérios para realização da extração de DNA humano das amostras de sangue periférico humano ou sangue em papel filtro para genotipagem.

2. ABRANGÊNCIA

Todos os envolvidos capacitados ou treinados (docentes, pesquisadores, alunos de graduação ou pós-graduação) para a realização da extração de DNA humano no Laboratório Multidisciplinar do Centro de Pesquisa Clínica Rosinha Viegas.

3. RESPONSABILIDADES

- Docente/Pesquisador responsável/coordenador da pesquisa em desenvolvimento,
- Alunos de graduação/Iniciação Científica ou pós-graduação treinados pelo Docente/Pesquisador responsável/coordenador da pesquisa em desenvolvimento

4. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

Materiais necessários:

- kit com os reagentes e descartáveis para extração do DNA (Qiagen® ou outro fornecedor)
- pipetas monocanais, termobloco, microcentrífuga refrigerada

Procedimento Operacional Padrão_ Extração de DNA

- ponteiros com filtro descartáveis, tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, *parafilm*, etiquetas de identificação
- etanol absoluto, luvas descartáveis, álcool 70%, tampão PBS
- vórtex, fluxo laminar

Observações antes do procedimento de extração do DNA:

- Antes e após a extração do DNA, o fluxo laminar deve ser esterilizado com álcool 70%.
- Todas as centrifugações devem ser realizadas à temperatura ambiente (15 a 25°C);
- Ligar o banho seco à 56°C;
- Os tampões AW1 e AW2 são concentrados. Para obtenção da solução de trabalho, ao iniciar o uso, adicionar etanol (96-100%), conforme indicação nos frascos. Anotar a data da adição e início do uso.
- Todas as centrifugações são realizadas em uma microcentrífuga refrigerada, configurada e manipulada de acordo com o manual do fabricante.

3.1. Procedimento para Purificação do DNA humano (sangue periférico ou sangue em papel filtro)

Adicionar 25 µl da protease (armazenado sob refrigeração – 2-8°C) em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril e identificado com a etiqueta do paciente;

Adicionar 250 µl de amostra (sangue total ao tubo) ou 5 círculos de 1mm diâmetro do papel filtro com sangue periférico;

Adicionar 250 µl do Buffer AL na amostra. Homogeneizar no vórtex por 30 segundos;

Incubar a 56°C por 10 minutos, homogeneizando de 5 em 5 minutos por 15 segundos no vórtex;

Centrifugar rapidamente (spin - 30 segundos à 8000 rpm) o tubo de microcentrífuga para remover gotas no interior da tampa;

Adicionar 250 µl de etanol (96-100%) na amostra e homogeneizar no vórtex por 25 segundos. Centrifugue rapidamente (spin) o tubo de microcentrífuga para remover gotas no interior da tampa;

Transferir a amostra do tubo (300 µl) para a coluna do kit (conjunto coluna e tubo coletor). Fechar a tampa e centrifugar à 8000 rpm (6000xg) por 1 minuto;

Descartar o tubo coletor com o sobrenadante e transferir a coluna para um tubo coletor limpo. **Repetir o item anterior;**

Descartar o tubo coletor com o sobrenadante e transferir a coluna para um tubo coletor limpo;

Adicionar 500 µl do Buffer AW1. Feche a tampa e centrifugue a 8000 rpm (6000xg) por 1 minuto;

Descartar o tubo coletor com o sobrenadante e transferir a coluna novamente para o mesmo tubo coletor.

Adicionar 500 µl do Buffer AW2. Feche a tampa e centrifugue a 14.000 rpm (20.000xg) por 3 minutos;

Descartar o tubo coletor com o sobrenadante e transferir a coluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril e identificado com as iniciais do paciente e o número sequencial do DNA em etiqueta na tampa do tubo;

Adicionar 100 µl do buffer AE na coluna. Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente (15 a 25°C) e centrifugar a 8000 rpm (6000xg) por 1 minuto;

Transferir o sobrenadante (100 µl do buffer AE) novamente para a coluna e centrifugar novamente a 8000 rpm (6000xg) por 1 minuto;

Envolver a tampa com *parafilm* e armazenar o tubo em caixa identificada pela ordem numérica (por exemplo, CAIXA 1 – DNA HUMANO 1-100);

Estocar o DNA extraído em temperatura refrigerada (2-8°C) ou congelada (-10°C) por 5 anos;

Procedimento Operacional Padrão_ Extração de DNA

Preencher o formulário de Extração de DNA de acordo, disponível na pasta do paciente.

Nota: Um volume de 200 µl de sangue periférico humano rende, aproximadamente, 6 µg de DNA (30 ng/ µl) em 200 µl de buffer AE, com uma razão A_{260}/A_{280} de 1,7 – 1,9.

5. PONTOS CRÍTICOS/RISCOS

Condições das amostras, validade e estabilidade dos reagentes utilizados, temperaturas dos equipamentos, esterilização do ambiente de trabalho.

Identificação incorreta de amostras.

6. REGISTROS

ANEXO I - RE_DNA01_FORMULÁRIO EXTRAÇÃO DNA_GENOTIPAGEM

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Protocolo QiAamp DNA blood Mini Kit®, Qiagen

Procedimento Operacional Padrão_ Extração de DNA

ANEXO I - RE11_ Formulário extração DNA_ Genotipagem

Nº amostra:

Nome do paciente:

LAB:

data de nascimento:

Hipótese clínica:

Sexo do paciente:

Tipo de amostra:

Data de entrada: __/__/__

Observação:

EXTRAÇÃO DE DNA

Método de extração DNA: Qiagen® QIAmp DNA Blood minikit - lote: _____

Qualidade do DNA (1)

Data da extração: __/__/__

Hora: __:__

Número do DNA:

Caixa do DNA nº:

Responsável:

ANÁLISE MOLECULAR

Data da análise: __/__/__

Responsável: _____

Resultado: _____

Procedimento Operacional Padrão_Extração de DNA

ANEXO II

Controle de Revisão

Data	Versão	Revisor	Alteração