



**Procedimento Operacional Padrão - POP**

Página 1 de 10

<b>Código</b> IMT-POP-BB-001	<b>Data</b> emissão 17/12/2012	<b>Data</b> vigência 17/12/2012	<b>Próxima</b> revisão 17/12/2014	<b>Versão</b> 01
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

Biobanco

Procedimento Operacional Padrão para:

**Extração de DNA de sangue total**

POP: V. 1.0

Nome: Extração de DNA em sangue total

Data Efetiva: dezembro, 2012

autora: Erika Regina Manuli

Aprovação            Profa. Dra. Ester C. Sabino

Assinatura

data


Dra. Léa Campos de Oliveira

Assinatura

data

Histórico de revisão

Versão	Descrição	Revisado por	Data
1.0			

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 2 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-001</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

### **OBJETIVO**

Este procedimento operacional padrão (POP) descreve como processar o sangue periférico obtido de pacientes para extração de DNA a partir de leucócitos.

### **APLICAÇÃO**

Este POP aplica-se ao manuseio de sangue de pacientes para os laboratórios participantes do Biobanco .

### **DIVULGAÇÃO**

Este POP é mantido em arquivo e uma cópia em papel com autorização do responsável pelo biobanco.

Uma cópia papel pode ser emitida pelo Responsável Documentação:

- desde que o nome da pessoa ou entidade destinatária desta cópia conste do quadro abaixo de Usuários Principais com a menção “Cópia papel”;
- ou, em caso excepcional, com a prévia autorização do emitente deste POP.

### **EMISSÃO, REVISÃO E APROVAÇÃO**

Este POP foi:

- **Emitido por** : Erika R. Manuli
- **Revisado por** : Dra. Léa Campos de Oliveira
- **Aprovado por:** Profa. Dra. Ester C. Sabino



## Procedimento Operacional Padrão - POP

Página 3 de 10


<b>Código</b> IMT-POP-BB-001	<b>Data</b> emissão 17/12/2012	<b>Data</b> vigência 17/12/2012	<b>Próxima</b> revisão 17/12/2014	<b>Versão</b> 01
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

### USUÁRIOS PRINCIPAIS

acesso	nome	área
Cópia Papel		
Cópia Papel		
Cópia Papel		
Cópia Papel		

### HISTÓRICO

VERSÃO	DATA	PÁGINA	NATUREZA DA MUDANÇA
1	15/09/2012	1 a 6	Criação do documento

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 4 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-001</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

**Princípio:** É uma técnica moderna que utiliza um kit que contém uma coluna, que inicialmente retém o ácido nucléico. Ela utilizada enzima proteolítica (proteínase K) para remover proteínas de uma solução com ácido nucleico e duas soluções de lavagem AW1 e 2, que proporcionam um DNA de maior pureza. No final do procedimento o DNA é eluído da coluna com o uso de uma solução de eluição, que mantém a estabilidade do DNA.

**Aplicação:** Extração de DNA a partir de amostra sangue de sangue periférico.

**Amostra:** amostra de sangue total periférico, obtida a partir de coleta em tubo primário contendo o anticoagulante EDTA.

#### **Materiais e equipamentos**

Avental, máscaras, óculos de proteção e luvas sem talco

Pipetas automáticas

Ponteiras de filtro estéril


Tubos de 1,5 mL a 2,0 mL estéreis

Tubos tipo falcon de 15 mL estéreis

Tubos de coleta sangue a vácuo com anticoagulante EDTA

Criotubos de 0,5 mL

Tampas de cor amarela

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 5 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-001</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

Gaze estéril  
Caixas de armazenamento  
Centrífuga de tubos de ângulo móvel  
Centrífuga para microtubos  
Nanofotômetro  
Banho-maria  
Agitador de tubos  
Máquina de gelo  
Geladeira


#### **Reagentes**

Etanol absoluto (Merck)  
Etanol 70%  
Solução tampão fosfato (PBS)  
Solução de RNase AWAY  
QIAamp DNA Blood Midi Kit

#### **Cuidados básicos:**

##### **a. Coleta:**

Após a coleta, inverter várias vezes o tubo contendo EDTA cuidadosamente para homogeneização.  
Proceder à etapa de separação de plasma (veja POP específico CA-POP-BB-001).

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 6 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-001</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

O sangue pode ficar armazenado na geladeira por até 7 dias antes da extração de DNA.

**b. Laboratório:**

**Materiais:**

Qualquer material utilizado deve ser previamente autoclavado e as superfícies das bancadas e suportes limpas com etanol 70%.

**Reagentes que devem ser preparados:**

a. Preparar a solução de Protease estoque. Anotar a data.

A protease da Qiagen vem liofilizada e pode ser estocada a temperatura ambiente por até 1 ano. Para estocar por períodos maiores que 1 ano, a protease deve ser armazenada em geladeira.

Para reconstituir a protease, adicione 4,4 mL de água MilliQ no frasco de protease do kit QIAamp DNA Blood Midi Kit (20) ou 5,5 mL de água MilliQ no frasco de protease do kit QIAamp DNA Blood Midi Kit (100).

A protease reconstituída é estável por 2 meses na geladeira. O armazenamento em pequenas alíquotas a -20°C é ideal.


b. Agite bem o frasco do tampão AL antes do uso.

Se ocorrer a formação de um precipitado, aquecer a 56°C para dissolver.

c. Os tampões AW1 e AW2 são fornecidos concentrados. Adicionar os volumes adequados de etanol em cada tampão antes do primeiro uso, agitar bem e anotar na tampa a data de adição. Anotar a data.

O tampão AW2 é estável a temperatura ambiente por 1 ano.

Deixar o banho-maria ligado a 70°C.

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 7 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-001</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

Todos os passos de centrifugação são a temperatura ambiente.

Não utilizar centrífuga de ângulo fixo.

### **Procedimento**

1. Pipetar 200 µL de Protease QIAGEN no fundo de um tubo de 15 mL (não fornecido).

2. Adicionar 1-2 mL de sangue e misturar rapidamente.

Se o volume for inferior a 1 mL, adicione PBS até completar 2 mL.

A protease pode ser adicionada ao tubo já contendo o sangue. Neste caso, é importante certificar-se que a enzima adicionada foi misturada adequadamente.

3. Adicionar 2,4 mL de tampão AL e misturar invertendo o tubo por 15 vezes, seguido de agitação vigorosa por pelo menos 1 min.

Para garantir uma lise adequada, a amostra deve ser misturada com o tampão AL até produzir uma solução homogênea.


Não adicione a protease diretamente ao tampão AL.

4. Incubar a 70°C por 10 min.

O rendimento de DNA atinge um máximo após lise por 70°C por 10 min, mas tempos de incubação mais longos não afetam o rendimento.

5. Adicionar 2 mL de etanol (96-100%) e misturar invertendo o tubo por 10 vezes, seguida de agitação vigorosa.

Para garantir uma ligação eficiente, é essencial que a amostra seja misturada completamente após a adição do etanol para se obter uma solução homogênea.

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 8 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-001</b>	<b>Data</b> <b>emissão</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Data</b> <b>vigência</b> <b>17/12/2012</b>	<b>Próxima</b> <b>revisão</b> <b>17/12/2014</b>	<b>Versão</b> <b>01</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de DNA em sangue total				

Use somente etanol 96-100%. Outros tipos de álcoois podem reduzir o rendimento e a pureza do DNA.

6. Transferir metade da solução (3,3 mL) para uma coluna QIAamp Midi colocada em um tubo de 15 mL (fornecido), tomando o cuidado para não molhar a borda do tubo. Tampe e centrifugue a 1850 g (3.000 rpm) por 3 min.

Se a solução não passar completamente pela membrana da coluna, centrifugar novamente a uma velocidade um pouco maior.

Não apertar demais a tampa.

Sempre segurar as colunas em uma posição vertical mesmo que as tampas estejam fechadas para não correr o risco de algum líquido transbordar.

7. Remover a coluna, descartar o filtrado e colocar a coluna de volta o tubo de 15 mL. Transferir o restante da solução da etapa 5 para a coluna. Tampar e centrifugar novamente a 1.850 g (3.000 rpm) por 3 min.

Enxugar qualquer gota que tenha ficado no tubo de 15 mL antes de inserir novamente a coluna.

Não molhar a borda da coluna. Fechar cada coluna para evitar contaminação entre as amostras durante a centrifugação. Se a solução não passar completamente pela membrana da coluna, centrifugar novamente a uma velocidade um pouco maior.

8. Remover a coluna, descartar o filtrado e colocar a coluna de volta o tubo de 15 mL.

Enxugar qualquer gota que tenha ficado no tubo de 15 mL antes de inserir novamente a coluna.

Se o filtrado não for removido, a ponta da coluna ficará submergida no filtrado e a eficiência de lavagem será reduzida.





## Procedimento Operacional Padrão - POP

Página 9 de 10

<b>Código</b>	<b>Data emissão</b>	<b>Data vigência</b>	<b>Próxima revisão</b>	<b>Versão</b>
<b>IMT-POP-BB-001</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2012</b>	<b>17/12/2014</b>	<b>01</b>

**Assunto:** POP para extração de DNA em sangue total

9. Adicionar 2 mL de tampão AW1 cuidadosamente sem molhar a borda. Fechar e centrifugar a 4.500 g (5.000 rpm) por 1 min.

Não descartar o filtrado neste passo e continuar diretamente na etapa 10.

10. Adicionar 2 mL de tampão AW2 cuidadosamente sem molhar a borda. Fechar e centrifugar a 4.500 g (5.000 rpm) por 15 min.

O aumento do tempo de centrifugação deve remover todos os traços de tampão AW2 da coluna antes da eluição. Se a força de centrifugação for menor que 4000 g, recomenda-se incubar a coluna por 10 min a 70°C para evaporar resíduos de etanol, que pode causar inibição de reações de PCR levando a resultados falso negativos.

11. Colocar a coluna em um tubo limpo de 15 mL (fornecido) e descartar o tubo de 15 mL contendo o filtrado.

Utilizar um lenço de papel para enxugar qualquer respingo da coluna antes de inseri-la no tubo novo.

12. Adicionar 300 µL de tampão AE a temperatura ambiente diretamente na membrana da coluna. Fechar e incubar por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 4.500 g (5.000 rpm) por 2 min.

Para armazenamento por longos períodos do DNA, recomenda-se alíquotar o DNA em alíquotas a -20°C.

13. Utilizar 1 µL do DNA (filtrado) para quantificação de em Nanofotômetro.

14. Separar o DNA em duas alíquotas em criotubos de 0,5 mL com tampa amarela, devidamente etiquetados a -80°C.

A caixa de armazenagem deve ser bem identificada. Cada alíquota deve estar em caixas e em freezers diferentes. Anotar as posições e caixas onde as alíquotas forem estocadas.