



**Procedimento Operacional Padrão - POP**

Página 1 de 10

<b>Código</b> IMT-POP-BB-002	<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 RNA total de sangue				

Biobanco

Procedimento Operacional Padrão para:

**Extração de RNA total de sangue**

---

POP: V. 1.0

Nome: Extração de RNA total de sangue

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-002</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 RNA total de sangue				

### **OBJETIVO**

Este procedimento operacional padrão (POP) descreve como processar o sangue periférico obtido de pacientes para extração de RNA 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-002	<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 RNA total de sangue				

### USUÁRIOS PRINCIPAIS

acesso	nome	área
Cópia Papel		
Cópia Papel		
Cópia Papel		
Cópia Papel		

### HISTÓRICO

VERSÃO	DATA	PÁGINA	NATUREZA DA MUDANÇA
1	17/12/2012	1 a 10	Criação do documento

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 4 de 10</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de RNA total de sangue				

**Princípio:** É uma técnica moderna que utiliza um kit que contém uma coluna, que inicialmente retém o ácido nucléico com pureza. No final do procedimento o RNA é eluído da coluna com o uso de uma solução de eluição, que mantém a estabilidade do RNA.

**Aplicação:** Extração de RNA 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**

Avental, máscaras, óculos de proteção e luvas sem talco

Pipetas automáticas

Ponteiras de filtro estéril

Seringas e agulhas de insulina

Tubos de 1,5 mL a 2,0 mL estéril

Tubos de coleta sangue a vácuo com anticoagulante EDTA (10mL K2-EDTA Vacutainer, Becton Dickinson)

Tubos de 15 mL ou 50 mL

Criotubos de 0,5 mL


Tampas de cor azul

Caixas de armazenamento de tubos

Gaze estéril

#### **Reagentes**

70% etanol

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 5 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-002</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 RNA total de sangue				

Etanol absoluto (Merck)  
 Solução de RNase AWAY  
 Tampão de lise EL (Qiagen)  
 RNeay Mini Kit (Qiagen)

#### **Equipamentos**

Centrífuga refrigerada de tubos  
 Centrífuga de microtubos  
 Bioanalyzer  
 Agitador de tubos  
 Máquina de gelo  
 Freezer -80°C

#### **Cuidados básicos:**

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

Após a coleta de sangue em dois tubos a vácuo (EDTA tubos), inverter várias vezes cuidadosamente para homogeneização.

O transporte dos tubos para o laboratório deve ser realizado em no máximo 30 minutos após a coleta de sangue! Anotar o horário de coleta.

Atenção: O tempo para começar o procedimento não deve exceder 1h

##### **b. Laboratório:**

##### **Materiais:**

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 6 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-002</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 RNA total de sangue				

Qualquer material utilizado deve ser previamente autoclavado e as superfícies das bancadas e suportes limpas com gaze estéril e solução de RNase Away

**Reagentes que devem ser preparados:**

- a. Preparar uma solução nova de etanol 70%.
- b.  $\beta$ -mercaptoetano ( $\beta$ -ME) deve ser adicionado ao tampão RLT antes do uso. Adicionar 10  $\mu$ L de  $\beta$ -ME para cada 1 mL de tampão. Anotar a data.

**Cuidado:  $\beta$ -ME é tóxico e deve ser manuseado na capela. Trabalhar usando máscaras reforçadas, luvas e óculos.**

O tampão RLT é estável a temperatura ambiente (15-25°C) durante 1 mês após a adição de  $\beta$ -ME.

c. O tampão RPE é fornecido concentrado. Adicionar o volume adequado de etanol em cada tampão antes do primeiro uso, agitar bem e anotar na tampa a data de adição.

d. O tampão RLT pode formar um precipitado durante o armazenamento. Se necessário, dissolver por aquecimento e manter a temperatura ambiente.

Deixar a centrífuga refrigerada ligada para alcançar a temperatura de 4°C.

**Procedimento**

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 7 de 10</b>
<b>Assunto:</b> POP para extração de RNA total de sangue				

### **Extração RNA total de sangue adaptado (RNeasy Mini Kit com lise de hemácias inicial)**

As células do sangue são lisadas em dois procedimentos independentes, uma para lise de hemácias (células vermelhas) e outra de leucócitos (células brancas). As hemácias do sangue humano não possuem núcleo e, portanto, não são importantes para a extração de RNA. Os leucócitos são as células das quais se isolam o RNA.

1. Utilizar um volume máximo de 1,5 mL de sangue total. Transferir para um tubo apropriado de 15 mL.

4. Adicionar 5 volumes de tampão EL em um tubo de 15 mL ou 50 mL.

Exemplo: 1,5 mL de sangue, adicionar 7,5 mL de tampão EL.

5. Incubar por 10-15 min em gelo. Misturar brevemente em agitador de tubos 2 vezes durante a incubação.


A mistura opaca torna-se translúcida durante a incubação, indicando a lise de hemácias. Se necessário, o tempo de incubação pode ser estendido para 20 min.

6. Centrifugar a 400 g por 10 min a 4°C. Descartar o sobrenadante virando o tubo delicadamente em um descarte e tirando o excesso com uma gaze estéril.

Cuidado para não perder o precipitado formado pelos leucócitos. Garantir que todo o sobrenadante seja removido. Pequenas quantidades de hemácias darão uma coloração avermelhada ao precipitado, que serão eliminadas no passo de lavagem seguinte.

7. Adicionar 2 volumes de tampão EL por volume de sangue. Ressuspender o precipitado completamente no agitador de tubos. Se necessário, utilizar uma pipeta.

Exemplo: para 1,5 mL de sangue inicial, adicionar 3 mL de tampão EL.

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 8 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-002</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 RNA total de sangue				

8. Centrifugar a 400 g por 10 min a 4°C. Descartar o sobrenadante completamente, retirando o excesso com uma gaze estéril.

Se necessário, remover com pipeta qualquer resíduo de hemácia. Cuidado para não perder o precipitado. Uma remoção incompleta do sobrenadante pode interferir na lise e subsequente ligação do RNA na coluna, resultando em um menor rendimento.

9. Adicionar 600 µL de tampão RLT e ressuspender completamente o precipitado em agitador de tubos.

O tampão RLT rompe as células. Nenhum aglomerado de células deve ser visível antes de prosseguir para a etapa de homogeneização. Se necessário, usar uma pipeta ou agitar mais tempo.

10. Passar a solução no mínimo 20 vezes em uma seringa de insulina estéril para completar a homogeneização.

Prosseguir para a etapa seguinte ou guardar. Nesta etapa o lisado pode ser estocado a -80°C por longo período para extração posterior.

Certificar-se de que houve uma homogeneização completa.


11. Adicionar 1 volume (600 µL) de etanol 70% ao lisado e homogeneizar muito bem com uma pipeta. Não centrifugar.

Precipitados podem ser visíveis após a adição de etanol, mas isso não afetará o procedimento.

12. Transferir cuidadosamente até 700 µL da amostra, incluindo qualquer precipitado, a uma coluna de RNeasy spin (coluna ROSA) colocado em um tubo de 2 mL (fornecido). Fechar a tampa com cuidado e centrifugar por 30 s a  $\geq 8.000$  g ( $\geq 10.000$  rpm). Descartar o filtrado.

Se o volume de amostra for maior do que 700 µL, centrifugue sucessivas alíquotas na mesma coluna ROSA. Descartar o filtrado e reutilizar o tubo na etapa seguinte.



	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 9 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-002</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 RNA total de sangue				

13. Adicionar 700 µL do tampão RW1 para a coluna ROSA. Fechar a tampa com cuidado e centrifugar por 60 s a  $\geq 8.000$  g ( $\geq 10.000$  rpm) para lavar a membrana da coluna. Descartar o filtrado.

Reutilizar o tubo no passo 14.

Após a centrifugação, retire com cuidado a coluna ROSA do tubo de 2 mL para que ela não entre em contato com o filtrado. Certifique-se de esvaziar o tubo completamente.

14. Adicionar 500 µL de tampão RPE para a coluna ROSA. Fechar a tampa suavemente e centrifugar por 60 s a  $\geq 8.000$  g ( $\geq 10.000$  rpm) para lavar a membrana da coluna. Descartar o filtrado.

Reutilizar o tubo de 2mL no passo 11.

15. Adicionar 500 µL de tampão RPE para a coluna RNeasy spin. Fechar a tampa suavemente e centrifugar por 2 min a  $\geq 8.000$  g ( $\geq 10.000$  rpm) para lavar a membrana da coluna.

A centrifugação mais longa seca a membrana da coluna, garantindo que nenhum etanol seja transferido durante a eluição de RNA. Etanol residual pode interferir em algumas reações.

Após a centrifugação, retire com cuidado a coluna ROSA do tubo de 2 mL para que ela não entre em contato com o filtrado. Caso contrário, pode ocorrer a transferência de etanol.

16. Opcional: Colocar a coluna ROSA em um novo tubo de 2 mL (fornecido) e descartar o tubo anterior com o filtrado. Centrifugar à velocidade máxima por 1 min. Executar este passo para eliminar qualquer possível resíduo de tampão RPE, ou se o filtrado residual permanece do lado de fora da coluna ROSA após a etapa 11.

	<b>Procedimento Operacional Padrão - POP</b>			<b>Página 10 de 10</b>
<b>Código</b> <b>IMT-POP-BB-002</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 RNA total de sangue				

17. Colocar a coluna ROSA em um novo tubo de 1,5 mL (tubo com ranhura, fornecido). Adicionar 30-50 µL de água livre de RNase diretamente à membrana coluna spin (no centro da membrana da coluna). Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.

Pegar gelo

18. Fechar a tampa suavemente e centrifugar por 1 min a  $\geq 8.000$  g ( $\geq 10.000$  rpm) para eluir o RNA.

Atenção: o RNA extraído deve ser mantido no gelo.

19. Descartar a coluna.

20. Separar uma alíquota de 1 µL no tubo de 0,2 mL para análise da concentração e qualidade do RNA em Bioanalyzer ou equivalente.

21. Estocar o RNA restante em duas alíquotas em criotubos de 0,5 mL, devidamente etiquetados a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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.