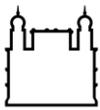


TÍTULO TIPO: POP	EXTRAÇÃO DE DNA PELO KIT WIZARD A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	CÓDIGO LHMM SR-04
		CLASSIFICAÇÃO SIGDA: 013.1

PALAVRA-CHAVE DNA; EXTRAÇÃO.	REVISÃO 16
---	-----------------------------

<p>SUMÁRIO</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Objetivo 2. Campo de Aplicação 3. Documentos Associados 4. Definições 5. Siglas 6. Condições Gerais 7. Procedimentos 8. Responsabilidades 9. Avaliação da Bibliografia 10. Referências Bibliográficas 11. Anexos <ul style="list-style-type: none"> A - Formulário de extração de DNA – Kit Wizard <p>1. OBJETIVO</p> <p>Este procedimento fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos para a extração de DNA a partir de amostras biológicas (por exemplo, tecido, sangue e fluidos em geral).</p> <p>2. CAMPO DE APLICAÇÃO</p> <p>Este procedimento aplica-se ao Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica e Referência Nacional em Esquistossomose (RNE) do Instituto René Rachou.</p>
--

ELABORADO AMANDA DOMINGUES	VERIFICADO CRISTIANE LAFETÁ	APROVADO ROBERTA CALDEIRA	DATA	PÁGINAS 7
--------------------------------------	---------------------------------------	-------------------------------------	-------------	---------------------



TÍTULO
TIPO: POP

**EXTRAÇÃO DE DNA PELO KIT WIZARD
A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

CÓDIGO
LHMM SR-04

3. DOCUMENTOS ASSOCIADOS

GQ-28 Paramentação e Conduta no Laboratório

GQ-53 Preparação de Álcool 70% e outras Soluções Alcoólicas

HMM-24 Preparação do Gel de Agarose para Visualização do DNA

LHMM SR-25 Reagentes e Soluções do Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica

BMIM-04 Utilização do Biofotometro Marca: Eppendorf

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica

5. SIGLAS

DNA	ácido desoxirribonucleico
°C	Grau Celsius
M	Molar
mg	Miligrama
pH	Potencial Hidrogeniônico
TE	Tris EDTA
EDTA	Ácido ethylenediaminetetraacetic
µl	microlitro
RPM	Rotações por minuto
“Pellet”	Precipitado
%	Por cento
LHMM SR	Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica – Serviço de Referência

6. CONDIÇÕES GERAIS

6.1. Este procedimento deve ser feito na sala de extração de DNA.

6.2. Os requisitos de biossegurança e conduta no laboratório devem ser seguidos de acordo com o GQ-28 tais como utilização de calça comprida, calçados fechados e baixos, jaleco de mangas compridas e luvas.

6.3. Preencher o ANEXO A deste documento.

TÍTULO
TIPO: POP

**EXTRAÇÃO DE DNA PELO KIT WIZARD
A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

CÓDIGO
LHMM SR-04

7. PROCEDIMENTOS

7.1. Extração de DNA pelo “KIT WIZARD®” (protocolo padronizado pelo LHMM):

7.1.1. Adicionar no tubo contendo a amostra 200 µL de solução de lise nuclear (vem com o kit) e em seguida adicionar 1µL (mínimo 0,25 µL e máximo 1,75µ L) de proteinase K (20mg/µL) (totalmente descongelado e não fornecido com o kit). Caso não exista proteinase K disponível para uso, seguir para o passo 7.2 e prosseguir com o protocolo sugerido pelo fabricante.

7.1.2. Colocar os tubos no banho seco a 37°C (mínimo 15 °C e máximo 60 °C) para lise do tecido. Deixar de 6 a 24 horas.

7.1.3. Adicionar 80 µL (mínimo 75 µL e máximo 88 µL) da solução de precipitação proteica (vem com o kit) e agitar vigorosamente usando o vórtex por 20 a 30 segundos.

7.1.4. Centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos, observando a formação de um “pellet”.

7.1.5. Transferir por inversão o sobrenadante para outro tubo, preferencialmente de 1,5 ml, devidamente etiquetado e descartar o tubo que ficar com “pellet”.

7.1.6. Adicionar à essa solução 200µL de isopropanol ($\text{CH}_3\text{CHOHCCH}_3$ não fornecido com o kit) e homogeneizar por inversão durante 20 minutos.

7.1.7. Centrifugar a 13000 rpm por 6 minutos e observar a formação de um “pellet”. Desprezar o sobrenadante por inversão ficando com o “pellet”.

7.1.8. Adicionar ao “pellet” 500µL de etanol absoluto (PA), gelado, (não fornecido com o kit) juntamente com 10µL (mínimo 1µL e máximo 20µL) de solução de acetato de sódio 3M pH 5.2 (não fornecido com o kit). Incubar essa mistura a - 20°C por 12 a 16 horas aproximadamente, ou à -70° por 2 horas.

7.1.9. Centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm observando a formação de um “pellet”. Desprezar o sobrenadante cuidadosamente, por inversão ficando com o “pellet”.

7.1.10. Adicionar 500µL de etanol 70%, gelado, (não fornecido com o kit), centrifugar por 10 minutos a 13000rpm observando a formação de um “pellet”. Desprezar o sobrenadante por inversão ficando com o “pellet”. Caso haja líquido ainda retirar com auxílio da pipeta.

7.1.11. Repetir o passo 7.1.10 - caso a amostra seja de grande volume (corpo inteiro do molusco, glândulas etc.).

BANCO DE DADOS SE SUITE

REVISÃO

16

PÁGINA

3 / 7

TÍTULO
TIPO: POP

**EXTRAÇÃO DE DNA PELO KIT WIZARD
A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

CÓDIGO
LHMM SR-04

7.1.12. Deixar os tubos abertos no banho seco a 37°C até todo etanol evaporar.

7.1.13. Adicionar 25µL de solução de reidratação (TE) (vem com o kit), deixar por 30 minutos (mínimo 15 minutos e máximo 45 minutos) à 37°C (mínimo 37 °C e máximo 60 °C) no banho seco e armazenar a -20°C.

7.1.13.1. A quantidade de solução de reidratação pode variar para mais ou para menos conforme o tamanho da amostra, por exemplo, para extração de DNA de tentáculo de caramujos utiliza-se 10 µL de solução de reidratação, para extração de DNA da região cefalopodal de caramujos utiliza-se 25 µL de solução de reidratação.

7.1.14. Se necessário, dosar o DNA em gel de agarose conforme POP HMM-24 ou em biofotometro conforme POP BMIM-04.

7.2. Extração de DNA pelo “KIT WIZARD®” (protocolo sugerido pelo fabricante, sem utilização da proteinase K):

7.2.1. Adicione 600 µL de **Nuclei Lysis Solution** a um tubo de 1,5 mL e resfrie no gelo;

7.2.2. Adicione 10–20 mg de tecido fresco ou descongelado à **Nuclei Lysis Solution** resfriada e homogeneize por 10 segundos;

7.2.3. Incube o lisado a 65°C por 15 a 30 minutos.

7.2.4. Macere o tecido com o auxílio de pistilo estéril e macerador (*pellet pestle motor*) por 1 minuto.

7.2.5. Adicione 3µL de **RNase solution** ao lisado nuclear e misture a amostra invertendo o tubo 2 a 5 vezes.

7.2.6. Incube a mistura por 15 a 30 minutos a 37°C. Deixe a amostra esfriar até a temperatura ambiente por 5 minutos antes de prosseguir.

7.2.7. Adicione 200 µL de **Protein Precipitation Solution** e agite vigorosamente em vórtex em alta velocidade por 20 segundos.

7.2.8. Resfrie a amostra no gelo por 5 minutos.

7.2.9. Centrifugue por 4 minutos a 13.000–16.000 × g. A proteína precipitada formará um pellet branco compacto.

TÍTULO
TIPO: POP

**EXTRAÇÃO DE DNA PELO KIT WIZARD
A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

CÓDIGO
LHMM SR-04

7.2.10. Remova cuidadosamente o sobrenadante contendo o DNA (deixando o pellet de proteína para trás) e transfira-o para um tubo de 1,5 mL contendo 600 µL de **isopropanol** à temperatura ambiente.

Nota: Algum sobrenadante pode permanecer no tubo original contendo o pellet de proteína. Deixe este líquido residual no tubo para evitar a contaminação da solução de DNA com a proteína precipitada.

7.2.11. Misture suavemente a solução por inversão (pelo menos 20 minutos) até que os filamentos brancos de DNA formem uma massa visível.

7.2.12. Centrifugue por 1 minuto a 13.000–16.000 × g em temperatura ambiente. O DNA será visível como uma pequena mancha branca. Descarte cuidadosamente o sobrenadante.

7.2.13. Adicione 600 µL de **etanol 70%** em temperatura ambiente e inverta suavemente o tubo várias vezes para lavar o DNA.

7.2.14. Centrifugue por 1 minuto a 13.000–16.000 × g em temperatura ambiente.

7.2.15. Aspire cuidadosamente o etanol usando uma pipeta Pasteur ou a ponta de pipeta. O pellet de DNA é muito solto neste ponto, e deve-se ter cuidado para evitar aspirar o pellet para dentro da pipeta.

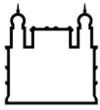
7.2.16. Inverta o tubo em papel absorvente limpo e seque o pellet em banho seco a 37°C por 10 a 15 minutos.

7.2.17. Adicione 50 µL de **DNA Rehydration Solution** (pode variar de acordo com o tamanho do pellet) e reidrate o DNA incubando a 65°C por 1 hora. Periodicamente misture a solução batendo suavemente no tubo. Como alternativa, reidratar o DNA incubando a solução durante a noite a 4°C.

7.2.18. Armazene o DNA no freezer -20°C. Preencha o Anexo A desse protocolo normalmente, adicionando uma observação sobre o uso desse protocolo sem a proteinase k para rastreabilidade futura.

8. RESPONSABILIDADES

Todos os colaboradores devidamente treinados para a execução deste procedimento.



TÍTULO
TIPO: POP

**EXTRAÇÃO DE DNA PELO KIT WIZARD
A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

CÓDIGO
LHMM SR-04

9. AVALIAÇÃO DA BIBLIOGRAFIA

A bibliografia foi avaliada e atualizada.

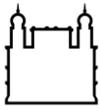
10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

PROMEGA CORPORATION. Techinal Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit. **Technical Bulletin**, p. 1–19, 2019. Disponível em: www.promega.com.

MANIATIS T, FRISTCH EF, SAMBROOK J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor publications, Cold Spring Harbor, New York.

11. ANEXOS

/ANEXO A



TÍTULO
TIPO: POP

**EXTRAÇÃO DE DNA PELO KIT WIZARD
A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

CÓDIGO
LHMM SR-04

ANEXO A

Formulário de extração de DNA – Kit Wizard

Formulário de extração de DNA – Kit Wizard

Marca, lote e validade dos reagentes:

Proteinase K	Solução de lise nuclear
Solução de precipitação proteica	Isopropanol
Acetato de sódio	Etanol 100%
Etanol 70%	Solução de reidratação de DNA

Equipamentos utilizados: nome/número de identificação

Banho seco: **Vórtex:**

Homogeneizador: **Centrifuga:**

Pipetas:

Protocolo de recebimento das amostras:

Amostras:

Região do organismo utilizada:

Volume final de solução de reidratação de DNA:

Responsável pela extração de DNA:

Data:

Observações:

LHMM SR-04 Anexo A Rev16