

TÍTULO TIPO: POP	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO GÊNERO <i>Biomphalaria</i>	CÓDIGO LHMM SR-05
		CLASSIFICAÇÃO SIGDA: 013.1
PALAVRA-CHAVE BIOMPHALARIA; DNA; PCR-RFLP.		REVISÃO 19

<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. Procedimento 8. Responsabilidades 9. Avaliação da bibliografia 10. Referências Bibliográficas 11. Anexos <p>A - PCR Específico. B - Restrição com Enzimas. C - Diagrama Esquemático dos Perfis de PCR-RFLP das Espécies Brasileiras do Gênero <i>Biomphalaria</i></p> <p>1. OBJETIVO</p> <p>Este procedimento fixa condições, padroniza, define e estabelece procedimentos para a identificação molecular de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>.</p>

ELABORADO AMANDA DOMINGUES DE ARAÚJO	VERIFICADO CRISTIANE LAFETÁ	APROVADO ROBERTA CALDEIRA	DATA	PÁGINAS 11
---	---------------------------------------	-------------------------------------	-------------	----------------------

TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este procedimento aplica-se ao Serviço de Referência Nacional em Esquistossomose (RNE) do Instituto René Rachou.

3. DOCUMENTOS ASSOCIADOS

LHMM SR-02 Registro de Recebimento, Fixação, Codificação e Exame dos Invertebrados.

LHMM SR-04 Extração de DNA Pelo Kit Wizard a partir de Amostras Biológicas.

LHMM SR-06 Preparação do Gel de Poliacrilamida para Visualização do DNA.

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

GQ-28 Paramentação e Conduta no Laboratório.

4. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

5. SIGLAS

Água <i>nuclease free</i>	Água livre de nucleases
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	PCR associado a polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição
Taq	Enzima DNA <i>polimerase Thermus aquaticus</i>
LHMM SR	Laboratório de Helmintologia e Malacologia Médica – Serviço de Referência

TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

U	Unidade
°C	Graus Celsius
mM	Milimolar
dNTP	Deoxynucleotideo trifosfato
RNA	Ácido Ribonucleico
MgCl ²⁺	Cloreto de magnésio
KCl	Cloreto de potássio
Tris-HCl	Tris – Ácido clorídrico
pH	Potencial Hidrogeniônico
mL	mililitro
Primer	“Iniciador”, sequência de oligonucleotídeos complementar a uma região da fita molde
Mix	mistura
µL	microlitro

6. CONDIÇÕES GERAIS

6.1. Este procedimento envolve locais diferenciados para execução, portanto em cada etapa foi descrito o local apropriado para desenvolver o processo.

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. Para a identificação molecular de moluscos do gênero *Biomphalaria* é feito um PCR da região espaçadora transcrita interna do gene do RNA ribossomal, seguido por uma digestão com a enzima de restrição *DdeI* (PCR-RFLP). Todo o procedimento de identificação molecular exige o uso de plásticos estéreis em cada etapa, não sendo permitida a reutilização destes. Para evitar contaminação, o laboratório utiliza um sistema de áreas individualizadas, sendo permitido apenas o fluxo de amostras na sequência descrita abaixo:

Área 1 (sala de mix PCR, capela de fluxo laminar) ► Área 2 (Extração de DNA, bancada para colocar DNA) ► Área 3 (Pós-PCR, sala de gel).

TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

7. PROCEDIMENTO

7.1. Mix de PCR: (Este procedimento deverá ser feito na sala de Mix PCR – capela de fluxo laminar). As anotações para a PCR deverão ser feitas no Anexo A e anexadas diretamente no livro de registro.

7.1.1. Etiquetar um tubo (0,2 mL ou 0,5mL) para cada amostra a ser amplificada.

7.1.2. Fazer os cálculos para a reação de PCR seguindo os valores abaixo (valores de referência para uma amostra) e preencher todos os dados no Anexo A e anexá-lo no livro de registro. As quantidades de todas as substâncias abaixo, exceto o DNA, devem ser multiplicadas pelo número de amostras mais 2 (margem de erro), e misturadas em um mesmo tubo (“mix” dos componentes da reação de PCR). Para garantir a confiabilidade da reação, deve-se incluir amostras de DNA como controle positivo de PCR. Designam-se DNA controle amostras previamente identificadas (os controles devem ser escolhidos de acordo com a identificação morfológica ou localidade de coleta dos moluscos). Além disso, todos os experimentos deverão ter um controle negativo (sem adição de DNA).

Componentes e volumes para mix de PCR (quantidade para 1 reação de 25 µL):

Reagente	Volume por amostra	CONCENTRAÇÃO FINAL (reação de 25 µL)
Água (água <i>nuclease free</i> , estéril)	q.s.p. 25 µL	---
dNTP mix (10 mM):	0,5 µL	0,2 mM (cada)
10X PCR Buffer, – Mg	2,5 µL	1x
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL	1,5 mM
Primer ETTS1 (10,0 µM):	0,5 µL	0,2 µM
Primer ETTS2 (10,0 µM):	0,5 µL	0,2 µM
Platinum™ <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 unidades/µL): (pode ser utilizado de 1U a 30U)	0,25 µL	1,25 U/reação
DNA diluído	Varia	≤500 ng/reação

TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

Componentes e volumes para mix de PCR (quantidade para 1 reação de 10 µL):

Reagente	Volume por amostra	CONCENTRAÇÃO FINAL (reação de 10 µL)
Água (água <i>nuclease free</i> , estéril)	q.s.p. 10 µL	---
dNTP mix (10 mM):	0,2 µL	0,2 mM (cada)
10X PCR Buffer, – Mg	1,0 µL	1x
MgCl ₂ (50mM)	0,3 µL	1,5 mM
Primer ETTS1 (10,0 µM):	0,2 µL	0,2 µM
Primer ETTS2 (10,0 µM):	0,2 µL	0,2 µM
Platinum™ <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 unidades/µL): (pode ser utilizado de 1U a 30U)	0,1 µL	1,25 U/reação
DNA diluído	Varia	≤500 ng/reação

ATENÇÃO!

Observar **sempre** a concentração dos reagentes, especialmente dos *primers* utilizados para o MIX de PCR. Para uma reação de 25 µL: quando o primer estiver na concentração de 50 mM utilizar um volume de 0,1 µL para cada amostra a ser amplificada; caso o primer esteja a 10 mM, utilizar um volume de 1 µL.

7.1.2.1. Sequência dos *primers*:

Sequência do primer ETTS1: (5'-TGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')

Sequência do primer ETTS2: (5'-TAACAAGGTTTCCGTAGGTGAA-3')

7.1.3. Descongelar totalmente todos os reagentes acima, fazer o mix dos componentes da reação de PCR e alíquotá-lo nos tubos já etiquetados (na cabine de fluxo laminar dentro da sala de MIX), colocando o volume total do mix menos o volume do DNA *template* diluído que será adicionado posteriormente, na Sala de Extração A solução contendo o mix que sobrar no tubo será utilizada como controle negativo de reação, sem adição de DNA na sala de Extração.

TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

7.1.4. Passo opcional: para termocicladores sem aquecimento na tampa, cobrir o mix aliquotado com uma gota de óleo mineral (para Biologia Molecular) e levar os tubos para a área designada para colocar DNA.

7.2. **Inserção do DNA no PCR:** (Este procedimento deverá ser feito na sala de Extração de DNA – bancada designada para colocar DNA no PCR).

7.2.1. Fazer uma diluição 50X do DNA a ser utilizado: retirar 1,0 µL do DNA estoque (extraído conforme POP LHMM SR-04) e transferir para outro tubo etiquetado contendo 49 µL de água (água *nuclease free*, ou Milli-Q® autoclavada).

7.2.1.1. A diluição do DNA pode ser diminuída ou aumentada de acordo com a quantidade ou concentração do DNA estoque.

7.2.2. Inserir o DNA diluído nos tubos aliquotados, contendo o mix da PCR. Tampar o tubo, vortexar por 5 segundos e transferi-lo pela janela para a sala de gel.

7.2.3. Na sala de gel, centrifugar o tubo por 3 segundos a 13.000 RPM.

7.3. **Amplificação do DNA:** (Este procedimento deverá ser feito na sala de gel – Pós-PCR).

7.3.1. Colocar os tubos na máquina de PCR (termociclador) preferencialmente quando a temperatura atingir temperaturas superiores a 75°C no programa que contém os seguintes ciclos:

- 1 - 95°C por 3 minutos
- 2 - 54°C por 1 minuto (pode usar de 44°C a 64°C)
- 3 - 72°C por 2 minutos
- 4 - 95°C por 45 segundos
- 5 - 32 vezes do passo 2 até 4 (pode ser de 20 a 50 vezes)
- 6 - 54°C por 1 minuto (pode usar de 44°C a 64°C)
- 7 - 72°C por 5 minutos
- 8 - Final

7.3.2. Após a amplificação, deve-se visualizar o DNA em gel de Poliacrilamida conforme POP LHMM SR-06. Caso a amplificação tenha sido observada, prosseguir para o passo seguinte, de restrição com enzimas.

7.4. **Mix para produção dos perfis de restrição:** (este procedimento deverá ser feito na sala de Mix PCR – cabine de segurança biológica). As anotações para a produção dos

TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

perfis de restrição poderão ser feitas no Anexo B ou no caderno de registro, mas neste caso deve-se anotar todas as informações presentes no anexo B.

7.4.1. Descongelar o tampão da enzima totalmente.

7.4.2. Calcular o mix para a digestão que deverá conter (por amostra) 1µL do tampão da enzima e 0,3µL (entre 0,1 µL e 1 µL) da enzima de restrição *Ddel*. Multiplicar este valor pelo número de amostras a serem digeridas mais 2 (margem de erro), e fazer o mix em um tubo único, para posteriormente aliquotar 1,3 µL em cada tubo etiquetado com os códigos das amostras a serem digeridos.

7.4.3. Transferir o tubo com o mix pela janela para a sala de gel (pós-PCR);

7.5. Inclusão do mix nas amostras a serem digeridas: (Este procedimento deverá ser feito na sala de gel – Pós-PCR)

7.5.1. Colocar 40 µL de água diretamente no tubo com o produto amplificado pela PCR (água *nuclease free* ou Milli-Q® autoclavada). Nos casos em que o produto da PCR específica gerar fragmentos fracos a diluição pode ser diminuída e nos casos em que o produto da PCR específica gerar fragmentos fortes a diluição pode ser aumentada.

7.5.2. Retirar 10 µL da amostra diluída e colocar em um tubo etiquetado correspondente, contendo 1,3 µL do mix da enzima, totalizando 11,3 µL no tubo (para cada amostra).

7.5.3. Centrifugar o tubo por 3 segundos à 13.000 RPM I.

7.5.4. Colocar os tubos na máquina de PCR (termociclador) e acionar o programa que contém os seguintes ciclos:

- 1 - 37°C por 3 horas e 30 minutos
- 2 - 80°C por 20 minutos
- 3 - Final

7.5.5. Visualizar o DNA digerido em gel de Poliacrilamida conforme POP LHMM SR-06.

7.6. Comparação dos perfis de restrição: (Este procedimento deverá ser feito na sala de gel - Pós-PCR). Recomenda-se a utilização de amostras controle de espécie conhecida para comparação dos perfis de restrição.

Após a visualização do DNA em gel de poliacrilamida os resultados obtidos devem ser comparados com os perfis espécie-específicos, pré-estabelecidos para todas as espécies

BANCO DE DADOS SE SUITE

REVISÃO

19

PÁGINA

7 / 11

TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

brasileiras de moluscos do gênero *Biomphalaria* (Anexo C), e os resultados obtidos para o serviço de referência (RNE) deverão ser descritos no Registro de Recebimento de Moluscos, na parte que trata da identificação molecular (Anexo A do POP LHMM SR- 02).

8. RESPONSABILIDADES

Profissionais e colaboradores devidamente treinados para este fim.

9. AVALIAÇÃO DA BIBLIOGRAFIA

A bibliografia foi avaliada e atualizada.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

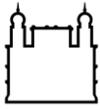
MANIATIS T, FRISTCH EF, SAMBROOK J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor publications, Cold Spring Harbor, New York.

Caldeira RL, Teodoro TM, Jannotti-Passos LK, Lira-Moreira PM, Goveia CO, Carvalho OS. 2016. Characterization of South American Snails of the Genus *Biomphalaria* (Basommatophora: Planorbidae) and *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Trematoda) in Molluscs by PCR-RFLP. Biomed Res Int (17).

INVITROGEN. 2019. Platinum™ Taq DNA Polymerase (10966-030). MAN0018458. REV: A.0.

11. ANEXOS

/ANEXO A



TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO
GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

ANEXO A

PCR Específico

PCR ESPECÍFICO

DATA: _____ **RESPONSÁVEL:** _____ **NÚMERO:** _____
INICIADORES / CONCENTRAÇÃO: _____
MÁQUINA: ()Maq 1: LAB 1300459 ()Maq 2: LAB 7011174 ()Maq 3:10020429 ()Maq: _____
PROGRAMA: ET1 **CAPELA DE FLUXO LAMINAR:** ECC1300473
AMOSTRA: [Concentração] →

COMPONENTES	LOTE	VAL	MIX (_µL)	PIPETAS
Água:				
Primer 1:				
Primer 2:				
dNTPs:				
Tampão:				
MgCl ₂ :				
Platinum™ Taq DNA Polymerase				
DNA				

Óleo mineral:
OBJETIVO:

LHMM SR-05 Anexo A Rev 19

CÓPIA NÃO-C

/ANEXO B

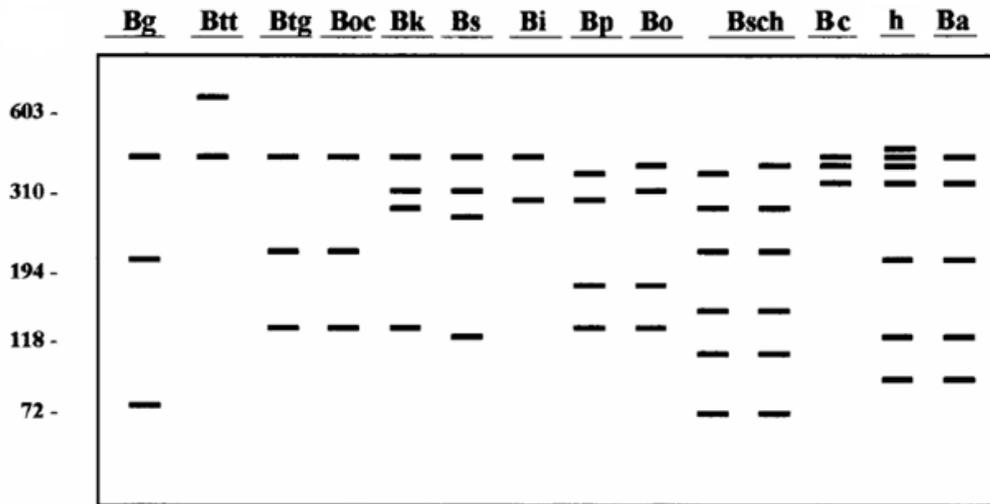
TÍTULO
TIPO: POP

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MOLUSCOS DO GÊNERO *BIOMPHALARIA*

CÓDIGO
LHMM SR-05

ANEXO C

Diagrama esquemático dos perfis de PCR-RFLP das espécies brasileiras do gênero *Biomphalaria*



LHMM SR-05 Anexo C Rev 19

CÓPIA NA