

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 1/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

1. OBJETIVO

Padronizar a extração de DNA a partir de sangue total periférico método orgânico, com digestão com proteinase K e posterior purificação com fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1987) no Laboratório de Genética Molecular e Humana na Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica – UACAP do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes.

2. RESPONSÁVEL

Biomédicos, Biólogos, Técnicos de Laboratório e Pesquisador responsável.

3. MATERIAIS NECESSÁRIOS

- EPI'S (luvas de procedimento, máscara cirúrgica, avental , óculos de proteção, gorro, sapato fechado);
- Tubo Falcon de 15 e 50 mL;
- Microtubos de 1,5 mL;
- Pipetas Pasteur de 2mL;
- Alça de inoculação descartável;
- Ponteiras de 10µL, 200µL, 1000µL;
- Micropipetas: p20, p200, p1000;
- Pipeta graduada;
- Pipetador automático;
- Placa petri;
- Provetas;
- Frasco de vidro com tampa;
- Barra magnética;
- Banho-maria;
- Centrífuga refrigerada;
- Caixa isotérmica;
- Máquina de gelo;
- Capela de exaustão de gases;
- Homogeneizador;
- Balança semi-analítica;

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 2/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023	Próxima revisão: 06/09/2025
		Versão: 1	

- Geladeira;
- Rack;
- Recipiente para descarte.

Reagentes

- Solução A;
- Solução B 1X;
- Solução C;
- Proteinase K;
- TE -Tris/EDTA – ver POP.UACAP.007;
- Acetato de sódio – ver POP.UACAP.007;
- Fenol;
- Clorofórmio;
- Álcool Isoamílico;
- Etanol absoluto gelado;
- Etanol 70% gelado;
- Água ultrapura e destilada;
- Água sanitária.

4. DESCRIÇÃO DO PROCEDIMENTO

1ª parte

- 4.1. EPI'S (luvas de procedimento, máscara cirúrgica, avental, óculos de proteção, gorro, sapato fechado);
- 4.2. Ligar o banho-maria e a centrífuga, configurar a 37°C e 4°C, respectivamente;
- 4.3. Preparar isopor com gelo e um recipiente com água sanitária para descarte;
- 4.4. Para cada amostra, identificar um tubo falcon de 50mL e 3 tubos falcon de 15mL (tubo e tampa);
- 4.5. Preparar a Solução A: 100mL para cada amostra;
- 4.6. Transferir a amostra do tubo com EDTA para o tubo falcon de 50mL e completar com solução A até atingir 50mL;
- 4.7. Homogeneizar por inversão e deixar em banho de gelo por 30 minutos (agitar por inversão a cada 10 minutos);

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 3/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

- 4.8. Centrifugar as amostras por 15 minutos a 2500 rpm a 4°C;
- 4.9. Descartar o sobrenadante por inversão cuidadosamente, de modo que o *pellet* formado permaneça aderido ao tubo (descarte em recipiente com água sanitária);
- 4.10. Completar com solução A até 30mL e agitar o tubo para desprender o pellet;
- 4.11. Centrifugar as amostras por 15 minutos nas mesmas condições;
- 4.12. Descartar o sobrenadante por inversão como na etapa 4.8, completar com solução A até 20mL e agitar o tubo para desprender o pellet;
- 4.13. Centrifugar as amostras por 15 minutos nas mesmas condições;
- 4.14. Adicionar 2ml de solução B1X e 500µl de solução C (preparada na hora);
- 4.15. Levar ao banho-maria por 16 horas (overnight) a 37°C ou 2 horas a 56°C.

2ª parte

- 4.16. Retirar do banho-maria, adicionar 1mL de TE 1X e o mesmo volume da amostra de fenol;
- 4.17. Homogeneizar por 5 minutos e centrifugar por 15 minutos a 2500 rpm à temperatura ambiente;
- 4.18. Transferir o sobrenadante (com pipeta pasteur) para o tubo falcon 1 (15mL) e adicionar o mesmo volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1);
- 4.19. Homogeneizar por 5 minutos e centrifugar nas mesmas condições;
- 4.20. Transferir o sobrenadante para o tubo falcon 2 (15mL) e adicionar o mesmo volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
- 4.21. Homogeneizar por 5 minutos e centrifugar nas mesmas condições;
- 4.22. Transferir o sobrenadante (trocar a pipeta pasteur) para o tubo falcon 3 (15mL);
- 4.23. Precipitar o DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 3M pH 5,5 e mesmo volume da amostra de etanol absoluto GELADO;
- 4.24. Inverter com cuidado até ocorrer a precipitação do DNA (formará uma “nuvem”);
- 4.25. Retirar o DNA com o auxílio de uma alça de inoculação descartável, já previamente identificada, e apoiar a alça na placa de petri;
- 4.26. Gotejar no DNA 10 gotas etanol 70% GELADO para eliminar o excesso de sal;
- 4.27. Aguardar a evaporação do etanol por aproximadamente 5 minutos;
- 4.28. Pipetar 200µL de TE 1X, no microtubo de 1,5mL previamente etiquetado com o código interno do paciente, para ressuspender o DNA;
- 4.29. Colocar a alça com o DNA no microtubo e realizar movimentos rotatórios até o DNA se desprender e deixar a temperatura ambiente;

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 4/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023	Próxima revisão: 06/09/2025
		Versão: 1	

4.30. Realizar a leitura da concentração de DNA por meio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm;

4.31. Avaliar a integridade da amostra por eletroforese em gel de agarose 0,8%;

4.32. Se, ao precipitar o DNA (4.23), não for visualizado DNA ou estiver fragmentado, centrifugar a amostra (2500 rpm à temperatura ambiente por 10 minutos), descartar o sobrenadante, inverter o tubo sobre um papel absorvente e aguardar a evaporação do etanol por 2 horas. Ressuspender o DNA com 100uL de TE 1X e transferir para microtubo previamente etiquetado.

5. RECOMENDAÇÕES

5.1. Fazer o uso dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI) e Coletiva (EPC);

5.2. Desinfetar a banca de trabalho e a capela de exaustão com álcool 70%, antes e depois do procedimento;

5.3. Separar recipiente de descarte, microtubos e ponteiros suficientes para o procedimento;

5.4. Antes de iniciar a extração de DNA, preparar as soluções A, B e C em quantidade suficiente para o número de amostras;

5.5. Ligar a centrífuga e banho-maria antes de iniciar a extração;

5.6. Descartar os materiais utilizados, resíduo biológico ou químico, no local correto;

5.7. O descarte do precipitado de fenol, deve ser no frasco de vidro que fica dentro da capela de exaustão.

6. AÇÕES EM CASO DE NÃO CONFORMIDADE (EVENTO ADVERSO)

6.1. Em caso de incidente com derramamento de sangue, interrompa o trabalho imediatamente, cubra a área com material absorvente (papel toalha), aplique água sanitária ou álcool etílico 70%. Caso necessário, solicitar à equipe de higienização do setor que faça uma limpeza na área;

6.2. Em caso de incidente com derramamento de produtos químicos, interrompa o trabalho imediatamente, verifique se não houve algum tipo contato entre o produto químico e seu corpo, consultar a Ficha de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ (no qual constam as orientações em caso de acidente), fazer a limpeza do local com material absorvente e, por fim, corrigir a causa do problema;

6.3. Em caso de acidente com respingos de produto químicos na região dos olhos ou qualquer outra parte do corpo lavar a região com água no lava-olhos ou chuveiro de emergência por, pelo menos, 15 minutos, consultar a Ficha de Segurança de Produtos Químicos - FISPQ (no qual consta as orientações em caso de acidente);

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 5/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

6.4. Comunicar ao responsável pelo setor e seguir o fluxo de acidente de trabalho da instituição.

7. FLUXOGRAMA

NA - Não Aplicável.

8. REFERÊNCIAS

LEAL, V. L. e Outros (org.). **Protocolos e técnicas laboratoriais de rotina: aplicações em biologia molecular, microbiologia, cultivo celular e farmacognosia.** Santa Cruz do Sul, RS: UNISC – Universidade de Santa Cruz do Sul, 2019. 224 p.

Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory

9. APÊNDICE

Apêndice A – Soluções A, B e C utilizadas na extração de DNA.

Apêndice B – Soluções utilizadas na extração de DNA.

Apêndice C – Fundamentação teórica da técnica.

10. ANEXOS

NA - Não Aplicável.

Apêndice A – Soluções A, B e C utilizadas na extração de DNA

Obs.: Os valores da tabela são referentes a uma (1) amostra. Fazer o cálculo de acordo com a quantidade necessária para o procedimento.

SOLUÇÃO A (tampão de lise) – 100mL

Sacarose 0,32M..... 10,953g
Tris-HCl 2M.....0,5mL
MgCl₂ 1M.....0,5mL
Triton X 100% 1mL
H₂O q.s.p..... 100mL

Pesar e pipetar os reagentes, adicionar o solvente e levar ao agitador magnético até dissolução total;
Completar para o volume final;
Identificar o frasco e armazenar na geladeira.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 6/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023	Próxima revisão: 06/09/2025
		Versão: 1	

SOLUÇÃO B 1X

EDTA 0,5M.....1mL
NaCl 5M.....100 µL
Tris HCl 2M 250 µL
H₂O ultrapura q.s.p25mL

Pipetar os reagentes e homogeneizar a solução;
Completar para o volume final;
Identificar o frasco e armazenar na geladeira.

SOLUÇÃO C

SDS 20%.....125 µL
H₂O ultrapura. 125 µL
Solução B 1X..... 250 µL
Proteinase K. 0,0005g

Em um tubo Falcon de 15 mL, pipetar todos os reagentes, deixando a proteinase K por último, em seguida, homogeneizar a solução.

Fonte: LGMH/UACAP/HUPAA/UFAL/EBSERH-2023.

Apêndice B – Soluções utilizadas na extração de DNA

FENOL:CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO (25:24:1) – 200mL		
Reagente	Concentração (em partes)	Volume corresponde (mL)
Fenol Equilibrado	25 partes	100 mL
Clorofórmio	24 partes	96 mL
Álcool isoamílico	1 partes	4 mL

CLOROFÓRMIO:ÁLCOOL ISOAMÍLICO (24:1) – 200mL		
Reagente	Concentração (em partes)	Volume corresponde (mL)
Clorofórmio	24 partes	192 mL
Álcool isoamílico	1 partes	8 mL

Fonte: LGMH/UACAP/HUPAA/UFAL/EBSERH-2023.



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 7/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

Apêndice C – Fundamentação teórica da técnica

A extração de DNA por método fenólico foi desenvolvida para a obtenção de DNA genômico de alta qualidade e para sua preservação a longo prazo.

Esta se baseia no fato de que íons salinos são atraídos pelas cargas negativas do DNA, permitindo sua dissolução e posterior extração da célula. O procedimento inclui lise seletiva das hemácias e outras células com detergente aniônico, que solubiliza os componentes celulares. A extração com fenol e clorofórmio provoca a desnaturação das proteínas de maneira eficiente, sua ação se fundamenta na propriedade hidrófoba das proteínas que apresentam afinidades por solventes orgânicos. O álcool isoamílico previne a formação de espuma. A proteína desnaturada forma uma camada na interface da fase orgânica e da fase aquosa, na qual se mantém o DNA.

A precipitação do DNA é feita com etanol absoluto associado a uma solução com alta concentração de um sal catiônico. O etanol absoluto gelado induz a transição estrutural das moléculas de ácido, fazendo-as se agregarem, com consequente precipitação. Além de concentrar o DNA, o etanol absoluto auxilia na remoção de resíduos de fenol e clorofórmio presentes na amostra. O etanol 70% remove os resíduos de sais.

O DNA purificado pode ser utilizado em uma variedade de técnicas, incluindo PCR, digestão com enzimas de restrição, sequenciamento, entre outros.

Fonte: LGMH/UACAP/HUPAA/UFAL/EBSERH-2023.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.002 - Página 8/8	
Título do Documento	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE TOTAL	Emissão: 06/09/2023 Versão: 1	Próxima revisão: 06/09/2025

11. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	RESPONSÁVEL PELA ELABORAÇÃO	DESCRIÇÃO DA ATUALIZAÇÃO
1	06/09/2023	Thaysa Johanne Borges Oliveira Débora de Paula Michelatto Reginaldo José Petrolí	Institui o Procedimento Operacional Padrão Extração de DNA Genômico de Sangue Total.

<p>Elaboração:</p> <p>Thaysa Johanne Borges Oliveira Biomédica do Laboratório de Genética Molecular e Humana/Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica</p> <p>Débora de Paula Michelatto Pesquisadora - Coordenadora do Laboratório de Genética Molecular e Humana/Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica</p> <p>Reginaldo José Petrolí Professor – Pesquisador Faculdade de Medicina/UFAL - campus A.C. Simões</p>	
<p>Análise:</p> <p>Ednaldo Almeida Gomes Chefe da Unidade de Análises Clínicas e Anatomia Patológica</p>	
<p>Validação:</p> <p>Serviço de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde/ Unidade de Vigilância em Saúde</p> <p>Setor de Gestão da Qualidade</p>	
<p>Aprovação:</p> <p>Valtuir Barbosa Felix Chefe da Divisão de Apoio Diagnóstico e Terapêutico</p>	

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que indicada a fonte