

EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Responsável(is):

- **Ângela Afonso** – Sala P0-C-077; Ext. 47047/92903; email: angelaafonso@fm.ul.pt
- **João Eurico Fonseca** – Sala P2-0-18; Ext. 47221; email: jcfonseca@fm.ul.pt

ELABORADO: Ângela Afonso

APROVADO: João Eurico Fonseca

ÍNDICE

1. OBJETIVO	3
2. DEFINIÇÕES	3
3. INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA	3
A. Interferências	3
4. DESCRIÇÃO / PROCEDIMENTO	3
A. Controlo de qualidade:	4
B. Back-up:	4
C. Transporte das amostras: (transporte de DNA do Biobanco para outros laboratórios)	4
D. Estabilidade do DNA purificado:	4
5. REGISTOS	5
A. Responsável(is):	5
B. Documentação de Apoio:	5

SOP.BIO.004 – EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

1. OBJETIVO

Este Procedimento Operativo Normalizado define os protocolos para extração e armazenamento de DNA a partir de amostras biológicas. Este DNA será posteriormente armazenado no Biobanco do IMM.

A extração de DNA será realizada apenas a partir de amostras de dadores que tenham assinado o consentimento informado.

2. DEFINIÇÕES

DNA – ácido desoxirribonucleico

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético

3. INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA

Como se tratam de amostras biológicas humanas não é possível garantir a ausência de risco infeccioso, pelo que devem ser manuseadas com as precauções mínimas de segurança indicadas nestas situações. As amostras deverão ser processadas apenas por profissionais com formação adequada. Durante todo o processo deverão ser usados bata, luvas e óculos.

A. Interferências

Todas as amostras de sangue colhidas em tubos com EDTA, citrato ou heparina podem ser usadas, no entanto recomenda-se a colheita em tubos com K₂EDTA.

4. DESCRIÇÃO / PROCEDIMENTO

4.1 Identificação da amostra

As amostras devem ser inequivocamente identificadas no momento da colheita, devem ser rotuladas e tratadas de forma a que se respeite o direito de privacidade do dador de acordo com a lei n.º 12/2005, publicado no Diário da República.

Cada tubo deverá ser rotulado com uma identificação que posteriormente gerará um código com o número de identificação, o que garante a rastreabilidade da amostra e separação de dados pessoais e clínicos.

4.2 Colheita de amostras

No que diz respeito à colheita de sangue, os procedimentos bem como o material a utilizar encontram-se descritos no SOP002.

No caso dos tecidos estes deverão ser congelados preferencialmente nos 30 minutos após a remoção do organismo.

Todas as amostras deverão vir acompanhadas com a seguinte informação: identificação, diagnóstico, cópia do consentimento informado, data e hora da colheita, nome e assinatura da pessoa que procedeu à colheita, quantidade e tipo de tubos, temperatura aproximada de transporte e notas relevantes.

4.3 Processamento:

i) Verificar se todas as amostras possuem a documentação necessária. Se algum dos documentos estiver em falta as amostras deverão ser colocadas na arca “Quarentena” e o responsável técnico do Biobanco deverá contactar a unidade ou pessoa responsável pelas amostras.

ii) Registrar as amostras na base de dados LIMS assim como os dados relevantes. Automaticamente será gerada uma etiqueta com um código.

iii) Processar adequadamente a amostra de acordo com as suas especificações e congelar à temperatura adequada.

iv) *Extração de DNA:* A extração de DNA deverá ser feita com kits adequados e que permitam garantir um bom rendimento de DNA puro.

O DNA poderá ser extraído manualmente, ou automaticamente, em sistemas especificamente desenhados para o efeito. A extração de DNA será realizada de acordo com o protocolo do fabricante.

SOP.BIO.004 – EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS
BIOLÓGICAS

Os investigadores que preferam entregar DNA já extraído deverão indicar a data de extração, qual o protocolo utilizado, bem como o valor dos parâmetros de qualidade e quantidade. Deverão ainda indicar a pessoa responsável pela extração para comunicar, no caso de alguma não conformidade. O Biobanco do IMM reserva o direito de não aceitar amostras de DNA extraído caso estas não cumpram os requisitos mínimos de qualidade.

v) *Quantificação do DNA e controlo de qualidade:* A fim de obter DNA adequado a todas as aplicações, como por exemplo PCR em tempo real, o tamanho do DNA deverá ser no máximo 150 kb.

O rendimento da extração do DNA é determinado a partir da concentração de DNA eluído e o valor da absorvência a 260nm, considerando que A_{260} de 1.0 = 50µg/ml de DNA. O valor da absorvência deverá ser entre 0,1 e 1,0 para que o rendimento seja considerado aceitável.

Para calibrar e diluir as amostras poderá usar-se tampão de eluição ou água estéril.

A pureza do DNA é determinada através do cálculo da razão da absorvência a 260 nm e a absorvência a 280nm. O DNA puro deverá ter uma razão A_{260}/A_{280} de 1,7-1,9, desta forma poderemos concluir que o DNA está livre de contaminação por proteínas.

vi) Introduzir os novos dados na base de dados do Biobanco do IMM.

A. Controlo de qualidade:

Todos os equipamentos utilizados, como as pipetas, a centrífuga e a arca ultracongeladora, devem ser verificados, limpos e desinfetados regularmente de acordo com as recomendações do fabricante.

B. Back-up:

As amostras serão armazenadas em dois conjuntos de alíquotas, cada conjunto numa arca diferente. Desta forma evita-se a sua perda no caso de incidentes técnicos no funcionamento das arcas.

C. Transporte das amostras: (transporte de DNA do Biobanco para outros laboratórios)

O transporte das amostras de DNA deverá ser feito a temperatura semelhante àquela em que as amostras se encontram armazenadas. O recipiente externo deverá conter a identificação do centro de recolha, a pessoa a contactar em caso de problemas, o recetor e as inscrições: "material biológico", "manusear com cuidado", o símbolo de perigo biológico e eventualmente, se for esse o caso, a indicação de presença de gás criogénico.

A acompanhar a amostra deverá seguir um formulário previamente preenchido com os seguintes dados: número e tipo de amostras, códigos de identificação, diagnóstico do dador, data e detalhes do processamento, concentração e qualidade das amostras, data de envio, temperatura de transporte, notas relevantes e instruções para a abertura da embalagem e do recipiente da amostra.

Após receção das amostras o laboratório deverá notificar o biobanco que recebeu as amostras.

Os detalhes de transporte devem ser registados na base de dados do Biobanco do IMM.

D. Estabilidade do DNA purificado:

A estabilidade do DNA é indeterminada. No entanto, é expectável um período de armazenamento de 10 anos.

SOP.BIO.004 – EXTRACÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS
BIOLÓGICAS

5. REGISTOS

Identificação dos registos	Indexação	Responsável pelo Arquivo
FORM.BIO.001	Base de dados LIMS	Ângela Afonso
Questionários	Base de dados LIMS	Ângela Afonso

A. Responsável(is):

- **Ângela Afonso** – Sala P0-C-077; Ext. 47047/92903; email: angelaafonso@fm.ul.pt
- **João Eurico Fonseca** – Sala P2-0-18; Ext. 47221; email: jcfonseca@fm.ul.pt

B. Documentação de Apoio:

- **SOP** – SOP.BIO.002