

EXTRACÇÃO DE RNA 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 RNA extraído no Biobanco para outros laboratórios) ..	4
D. Estabilidade do RNA purificado:	4
5. REGISTOS	5
A. Responsável(is):	5
B. Documentação de Apoio:	5

SOP.BIO.005 – EXTRACÇÃO DE RNA A PARTIR DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

1. OBJETIVO

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

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

2. DEFINIÇÕES

RNA – ácido ribonucleico

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

Após a colheita a amostra deverá ser convenientemente estabilizada. Uma vez que o RNA é altamente instável, as amostras poderão sofrer degradação, inibindo a extração do ácido nucleico.

As Ribonucleases (RNases) são enzimas muito estáveis e activas que, geralmente, não requerem cofactores para funcionar. As RNases são difíceis de inativar e até mesmo em pequenas quantidades são suficientes para destruir o RNA. Desta forma é aconselhável usar apenas material RNase free e adotar técnicas assépticas.

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 e estabilização do RNA

O sangue é colhido em vácuo, diretamente para tubos PAXgene, para estabilizar o RNA. A amostra deve ser mantida à temperatura ambiente pelo menos durante duas horas e só depois refrigerada.

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

4.3 Transporte para o laboratório

- Se o transporte for a 18-25°C, a amostra deverá chegar ao laboratório até 3 dias após a colheita de sangue;
- Se o transporte for a 2-8°C, a amostra deverá chegar ao laboratório até 5 dias após a colheita de sangue;
- Se o transporte for entre -20°C e -8 °C, a amostra é estável pelo menos durante 4 anos. Para o transporte das amostras de sangue fresco para o laboratório, ver SOP002.

4.4 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) No caso de o sangue congelar o tubo PAXgene entre -20 e -80°C.

iv) *Extração de RNA:* A extração de RNA deverá ser feita com kit adequado e que permita garantir um bom rendimento de RNA livre de contaminantes como DNA genómico.

SOP.BIO.005 – EXTRACÇÃO DE RNA A PARTIR DE AMOSTRAS
BIOLÓGICAS

O RNA poderá ser extraído manualmente ou automaticamente em sistemas automatizados. A extração de RNA será realizada de acordo com o protocolo do fabricante.

Os investigadores que preferirem entregar RNA já extraído deverão indicar qual o protocolo utilizado, bem como o valor dos parâmetros de qualidade e quantidade. Deverão ainda indicar quem é a pessoa responsável pela extração para comunicar, no caso de alguma não conformidade. O Biobanco do IMM reserva-se no direito de rejeitar as amostras que não cumpram os requisitos mínimos impostos.

v) *Controlo da quantidade e qualidade do RNA*: A quantidade de RNA é determinada a partir da concentração de RNA no volume em que é eluído, medindo a absorvância a 260nm e considerando que A_{260} de 1.0 = 40µg/ml de RNA em cadeia simples.

A razão entre as leituras a 260 nm e 280 nm (A_{260}/A_{280}) fornece uma estimativa da pureza do RNA relativamente a contaminações com proteínas. Como a razão A_{260}/A_{280} é influenciada consideravelmente pelo pH, para valores precisos, deverá medir-se a absorvância em tampão de eluição. Os valores de referência para esta razão são 1,8-2,1. Deve ainda dar-se atenção à absorvância medida a 230nm uma vez que a razão A_{260}/A_{230} indica contaminação com reagentes químicos (em especial sais caotrópicos e fenol). Os valores de referência para esta medição são também de 2,0.

vi) *Integridade e distribuição de tamanho*: Poderá ser verificada por eletroforese em gel de agarose desnaturante e coloração com brometo de etídio ou usando um Bioanalyzer. A intensidade da banda correspondente ao RNA ribossomal 28S deverá ser aproximadamente o dobro à correspondente à banda do RNA ribossomal 18S.

Se as bandas de RNA ribossomal não forem nítidas ou aparecerem como uma mancha, é provável que a amostra de RNA tenha sofrido degradação durante o processamento.

vii) 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.

Após a extração e controlo de qualidade do RNA, este deverá ser alíquotado em criotubos de 1.2ul e conservado a -80°C no local gerado automaticamente pelo software. Nestas condições prevê-se que não ocorra degradação de RNA durante pelo menos 1 ano.

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 RNA extraído no Biobanco para outros laboratórios)

As amostras de RNA congelado deverão ser transportadas à temperatura de -80°C e é fundamental manter a temperatura em todos os momentos, durante o armazenamento, transporte e emissão, de forma a evitar degradação da amostra.

O recipiente externo deverá conter a identificação 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 justificado, 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 da amostra enviada, data de envio, temperatura de transporte, notas relevantes e instruções para a abertura da embalagem e do recipiente da amostra.

Após receção, o laboratório deverá notificar o biobanco que recebeu as amostras. Os detalhes de transporte deverão ser registados na base de dados do Biobanco do IMM.

D. Estabilidade do RNA purificado:

O RNA puro é estável pelo menos durante um ano à temperatura de -80°C.

SOP.BIO.005 – EXTRACÇÃO DE RNA 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