

EXTRACÇÃO DE DNA DE BLOCOS DE PARAFINA

Prof. Carina Ladeira
Abril 2009

Introdução

- Técnicas baseadas na Biologia Molecular, que envolvem a amplificação de ácidos nucleicos tem sido utilizadas intensamente na detecção de cancro e doenças infecciosas
- Nas técnicas de amplificação com tecidos ou outras amostras clínicas importantes, impurezas nos ácidos nucleicos podem inibir ou reduzir a sensibilidade e eficiência da amplificação

Introdução

- Existem vários tipos de amostras onde pode ser realizada a extracção de DNA:
- Sangue periférico total
- Células epiteliais
- Mancha de sangue em cartão
- **Secções de tecido parafinado**

Extracção de DNA de tecidos em parafina

- A extracção de DNA a partir de tecidos incluídos em parafina é uma técnica particularmente útil em estudos retrospectivos em que a determinação de um diagnóstico molecular pode ser correlacionado com a ficha clínica do paciente
- As vantagens de um estudo deste tipo, isto é, um estudo retrospectivo de análise de DNA são múltiplas e podem ter inúmeras aplicações

Aplicações

- O estudo de numerosos processos de doença, em que vírus, bactérias ou parasitas são suspeitos de serem agentes etiológicos e eventual existência de correlação de prognóstico pode estar relacionada
- O estudo do DNA em doenças genéticas
- Estudos retrospectivos acerca de doenças raras, podendo através deste tipo de arquivos obter-se uma boa amostra comparativamente com os estudos prospectivos com tecidos a fresco
- A possibilidade de correlação de presença ou ausência de uma doença em particular, diagnóstico morfológico, estadio da doença, prognóstico e resposta a uma terapêutica, quando o diagnóstico clínico é conhecido

Procedimento

1. Cortes de 50 µm de blocos de parafina
2. Incubar em xilol durante 15' a 45°C
3. Centrifugar 10' a 14.000 rpm
4. Pipetar e descartar o sobrenadante
5. Repetir 2 – 4
6. Adicionar 1 ml de etanol 100% ao *pellet*, vortex, centrifugar durante 10' a 14.000 rpm e pipetar e descartar o sobrenadante
7. Adicionar 1 ml de etanol 70% ao *pellet*, vortex, centrifugar durante 10' a 14.000 rpm e pipetar e descartar o sobrenadante e secar o *pellet*

Procedimento

8. Ressuspender o pellet em 1 ml de NaSCN (1M) e incubar a 37°C *overnight*
9. Centrifugar durante 10' a 14.00 rpm, pipetar e descartar o sobrenadante
10. Ressuspender o *pellet* em 400 µl de tampão de extracção de DNA
11. Adicionar 5 µl de RNase (20 mg/ml) e incubar durante 1H a 37°C (o tratamento com RNase é opcional, o material em parafina não possui grandes quantidades de RNA)
12. Adicionar 40 µl de Proteinase K (10 mg/ml), vortex, incubar a 55°C *overnight*

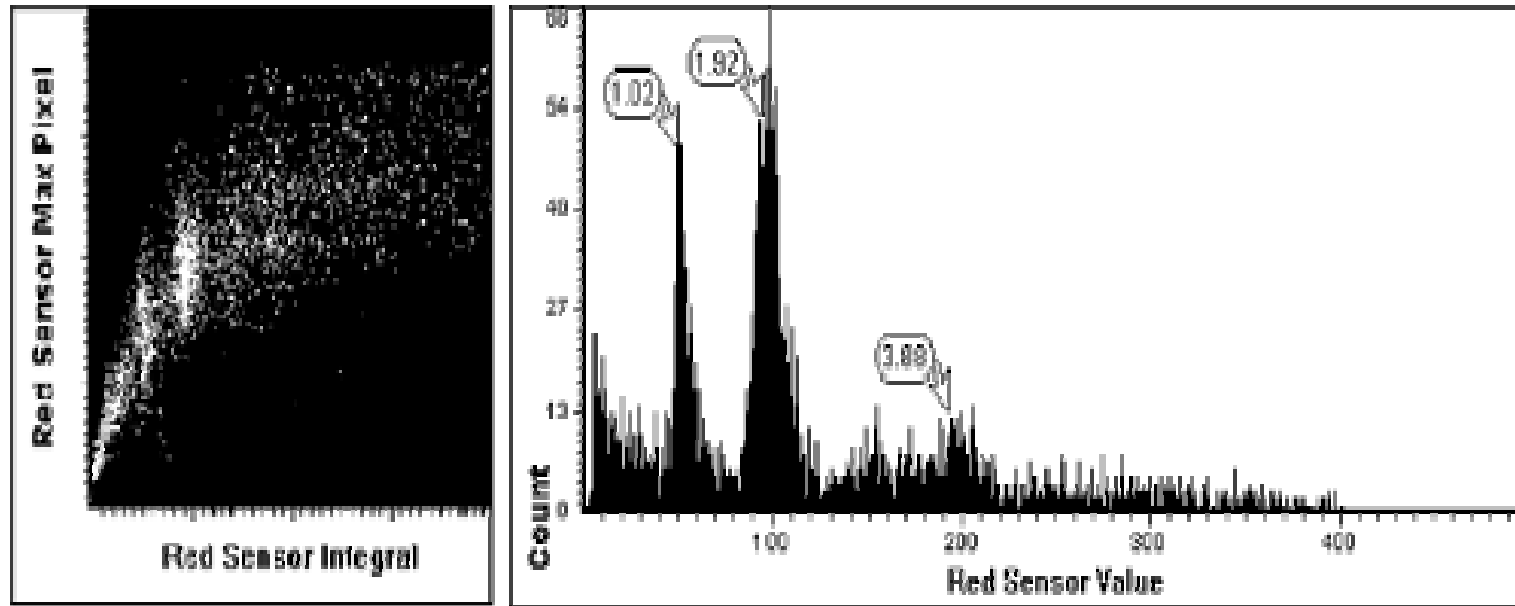
Procedimento

14. Adicionar 440 μl de fenol, agitar vigorosamente durante 5' e centrifugar durante 5' a 8000 rpm
15. Pipetar o sobrenadante para um novo tubo e adicionar a solução de 220 μl mais 220 μl fenol/clorofórmio (24:1), agitar vigorosamente e centrifugar durante 5' a 8000 rpm
16. Pipetar o sobrenadante para um novo tubo, adicionar 440 μl clorofórmio, agitar vigorosamente durante 5' e centrifugar durante 5' a 8000 rpm
17. Pipetar o sobrenadante para um novo tubo, adicionar 1/10 de acetato de sódio (pH 5.2), adicionar 3 volumes de etanol a 100% e manter o tubo durante 1H a -80°C ou *overnight* a -20°C

Procedimento

- Centrifugar durante 30' a 4°C
- Remover o sobrenadante
- Secar o *pellet*
- Adicionar 20-50 µl em água estéril
- Agitar gentilmente no *termomixer* a 37°C durante 2H
- Medir a concentração de DNA com um espectrofotómetro e correr em gel de agarose a 1%

Resultados



Análise de DNA dos núcleos de adenocarcinoma da mama

Existência de população aneuplóide que é representativa de tumor

RESUMO

- Introdução
- Extracção de DNA de tecidos em parafina
- Aplicações
- Procedimento
- Resultados