

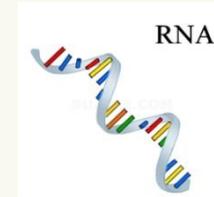
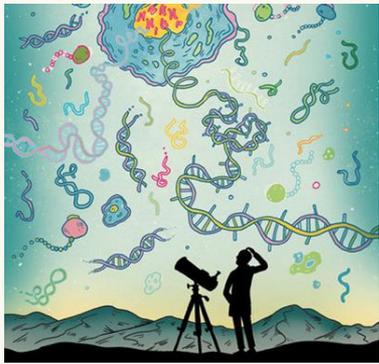


# **Extração de Macromoléculas: Técnicas e Aplicações**

**Eloisa H. R. Olivieri**  
**Banco de Macromoléculas**  
**AC Camargo Cancer Center**

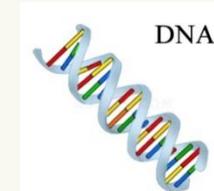
[eloisa.ribeiro@accamargo.org.br](mailto:eloisa.ribeiro@accamargo.org.br)

# Macromoléculas?



**RNA**

ÁCIDO RIBONUCLEICO



**DNA**

ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

ÁCIDOS  
NUCLEICOS  
(NA)

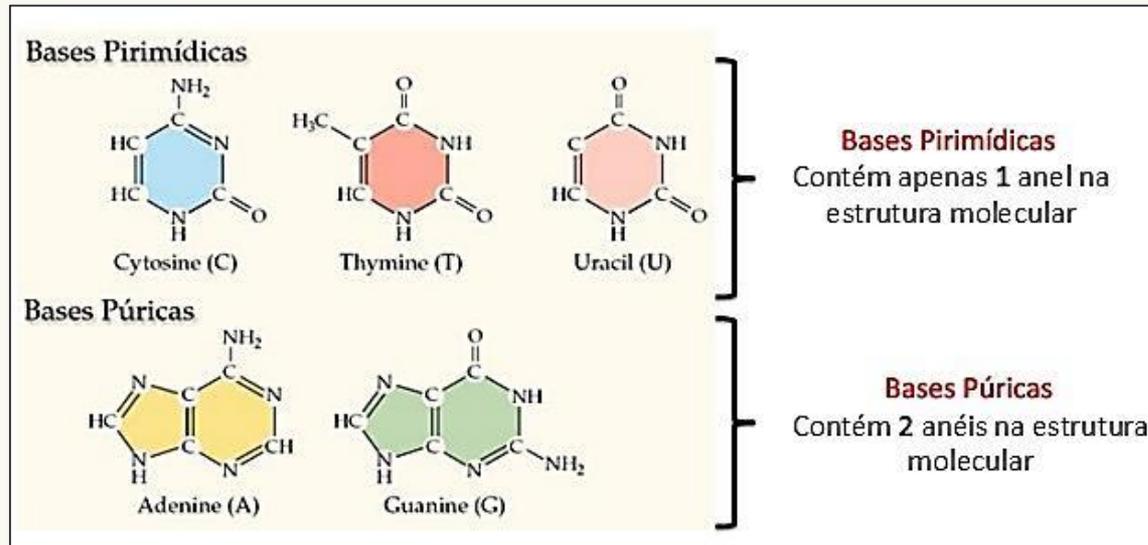
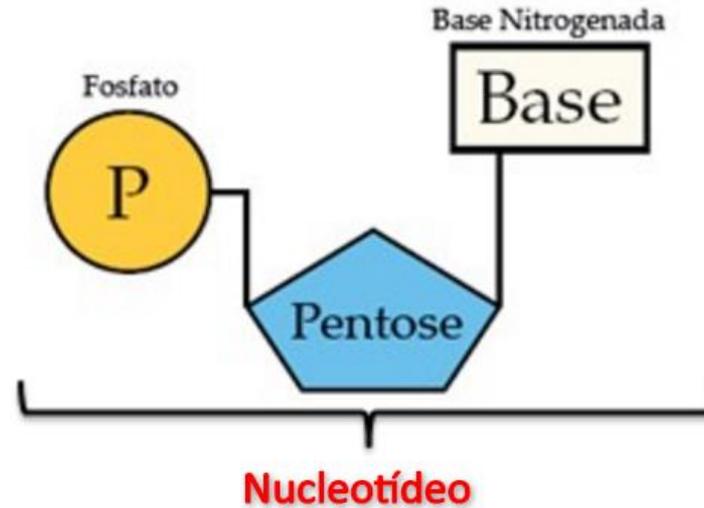
*Macromoléculas especializadas no armazenamento, na transmissão e no uso da informação genética*

## Composição Química

Os Ácidos Nucléicos são compostos por monômeros chamados **nucleotídeos**.

Estrutura de um nucleotídeo:

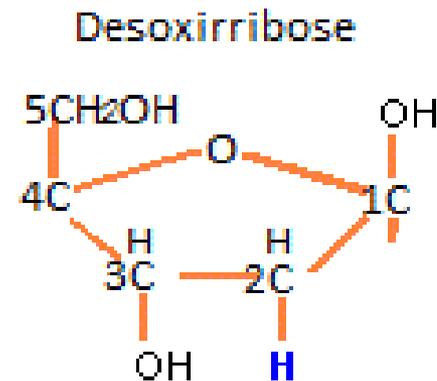
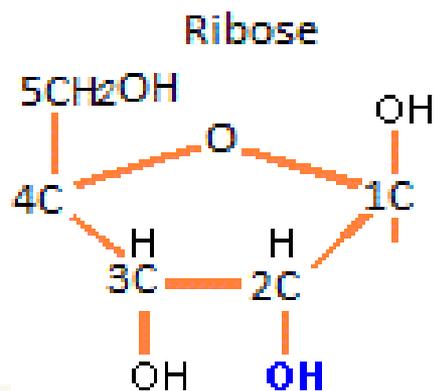
- 1 Fosfato
- 1 Pentose
- 1 Base Nitrogenada



# ÁCIDOS NUCLÉICOS



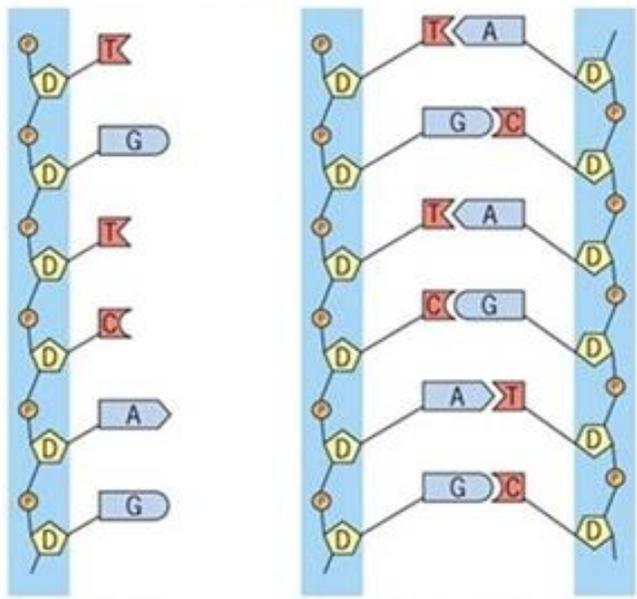
Pentoses dos Ácidos Nucléicos	
RNA	DNA
No RNA a pentose presente é a Ribose	No DNA a Pentose presente é a Desoxirribose



**Estabilidade:** o DNA é mais estável, principalmente pelo fato dos anéis de desoxirribose não possuírem grupo hidroxila (muito reativos) no C2` da pentose.

# DNA

P = Fosfato  
D = Desoxirribose



hélice

a e Cito:

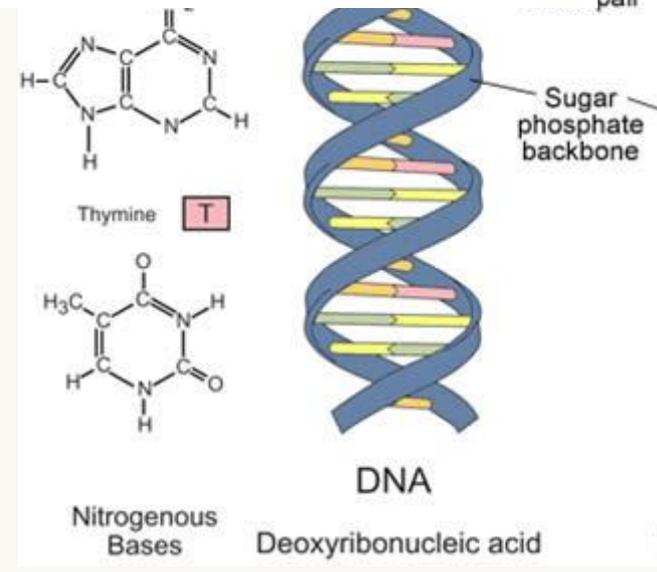
Sentido da síntese da fita complementar durante a replicação do DNA



b) G/C = 1

## 4. Quantidade

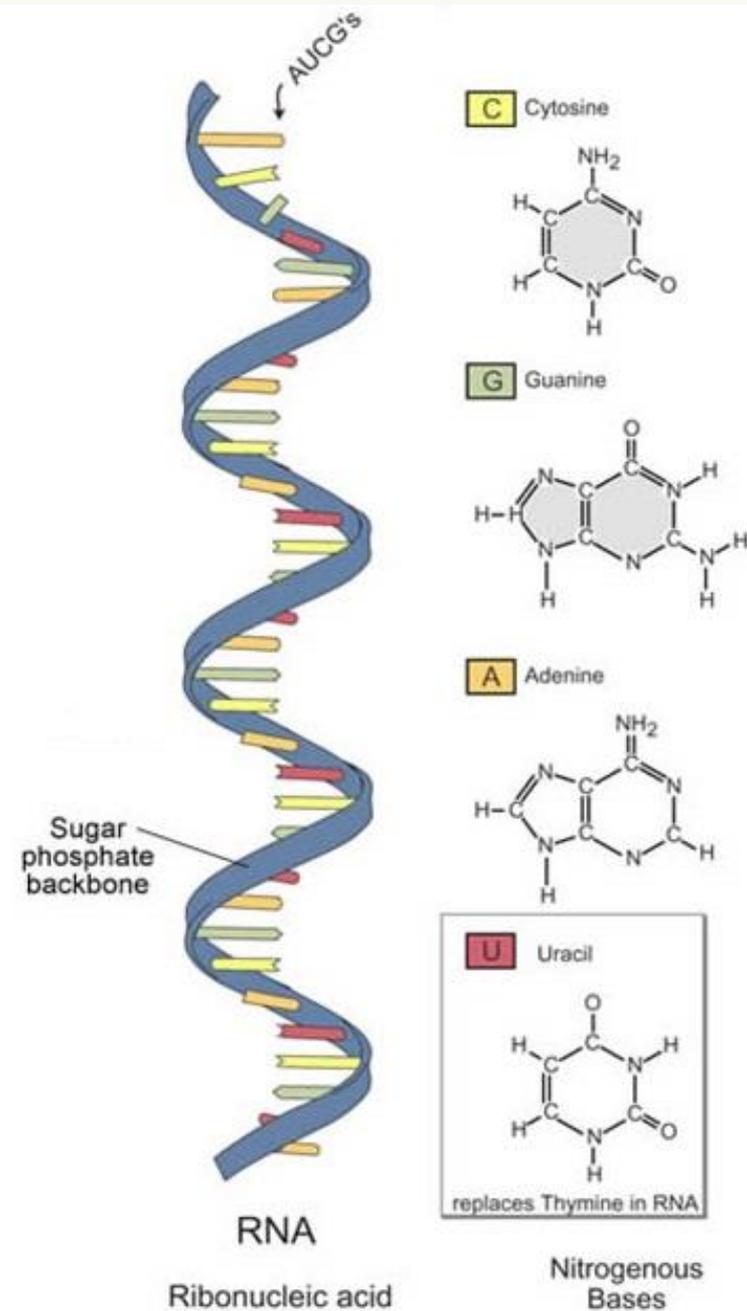
- a) Maior no núcleo/nuc
- b) Menor no citoplasma

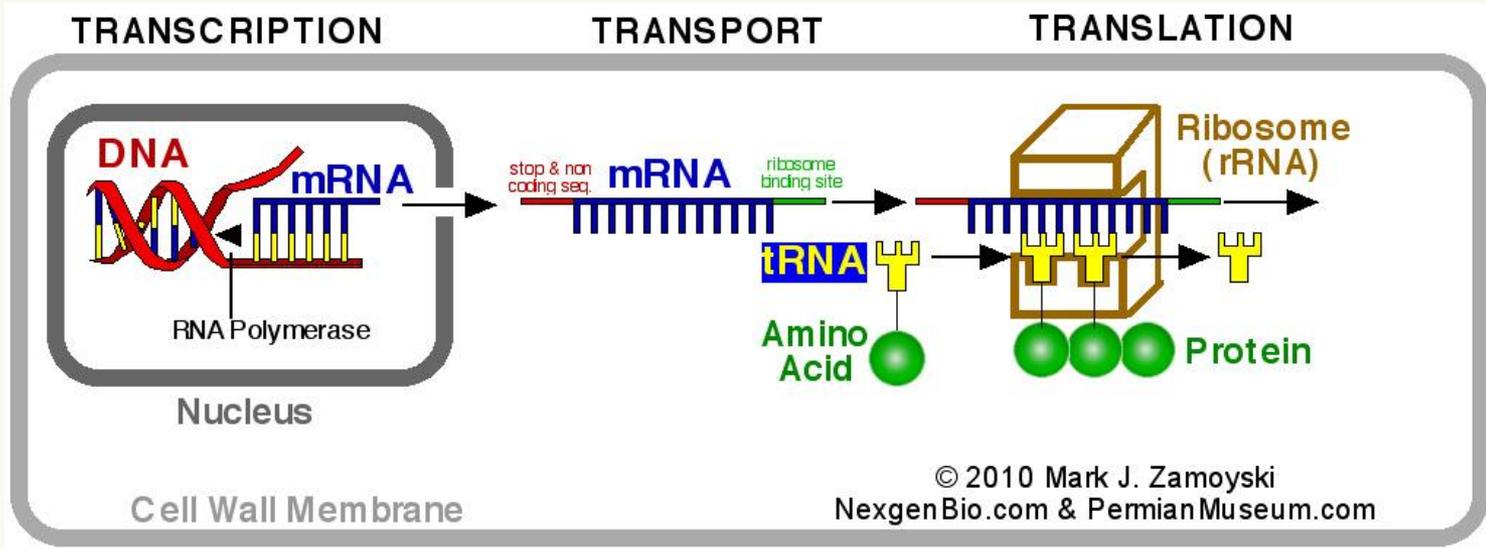
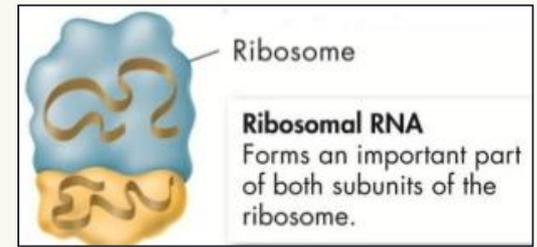
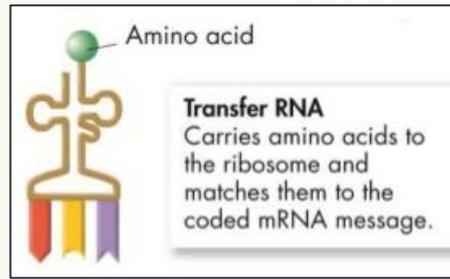
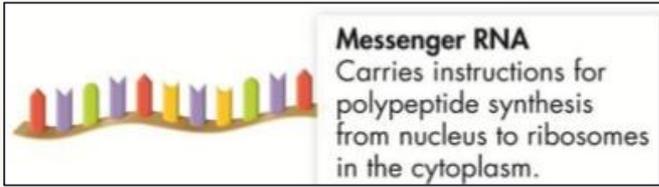


# RNA (Ácido Ribonucléico)

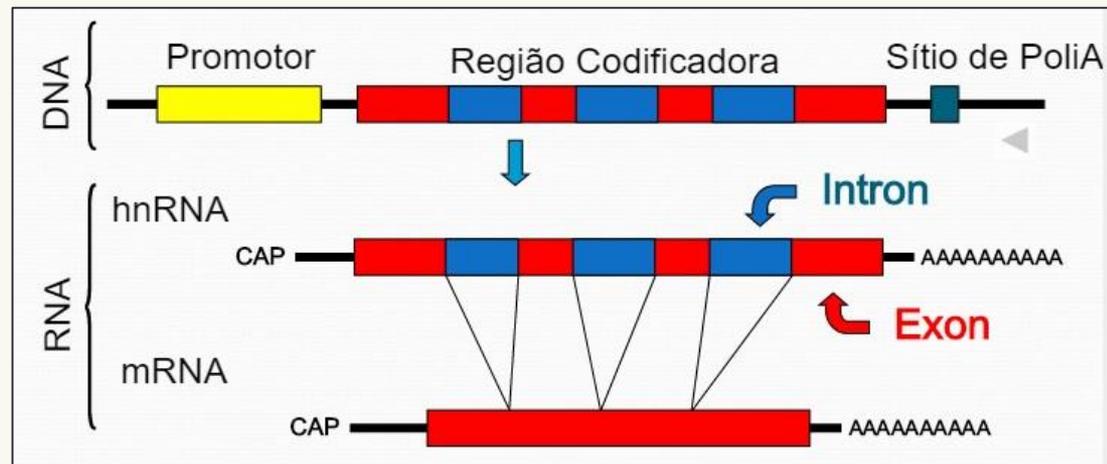
## Características:

1. **Local de Produção:** Núcleo da Célula (Transcrição)
2. **Estrutura:** 1 Fita (fita simples)
3. **Nucleotídeo contendo:**
  - a) Ribose
  - b) Bases Nitrogenadas:  
**Uracila**, Adenina, Guanina e Citosina
  - c) Fosfato
4. **Tipos de RNA:**
  - a) RNAm (Mensageiro)
  - b) RNAt (Transportador)
  - c) RNAr (Ribossômico)

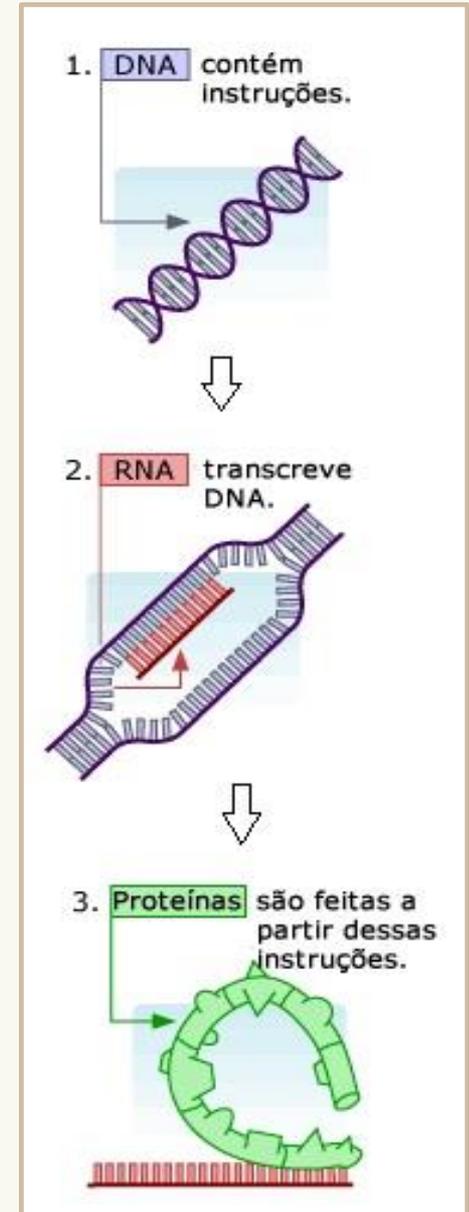
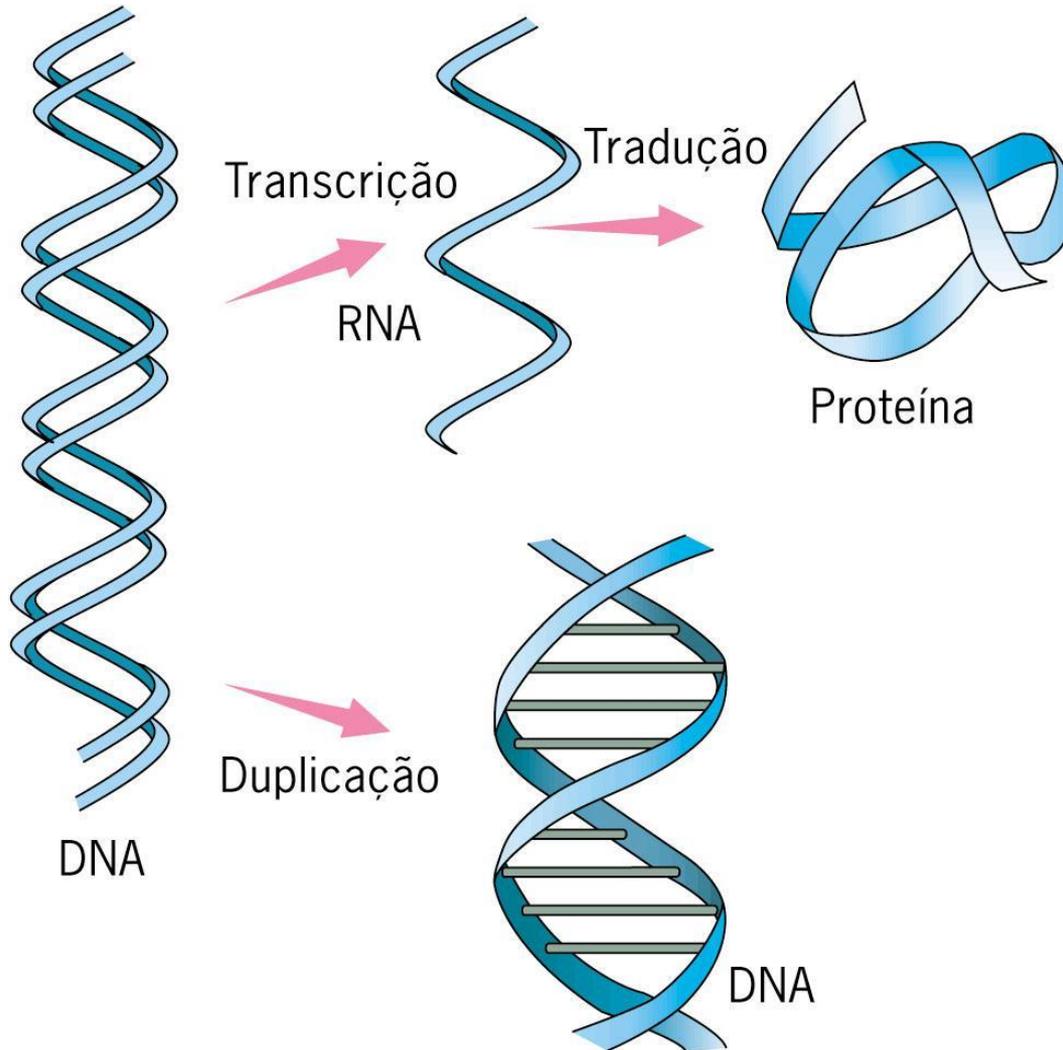




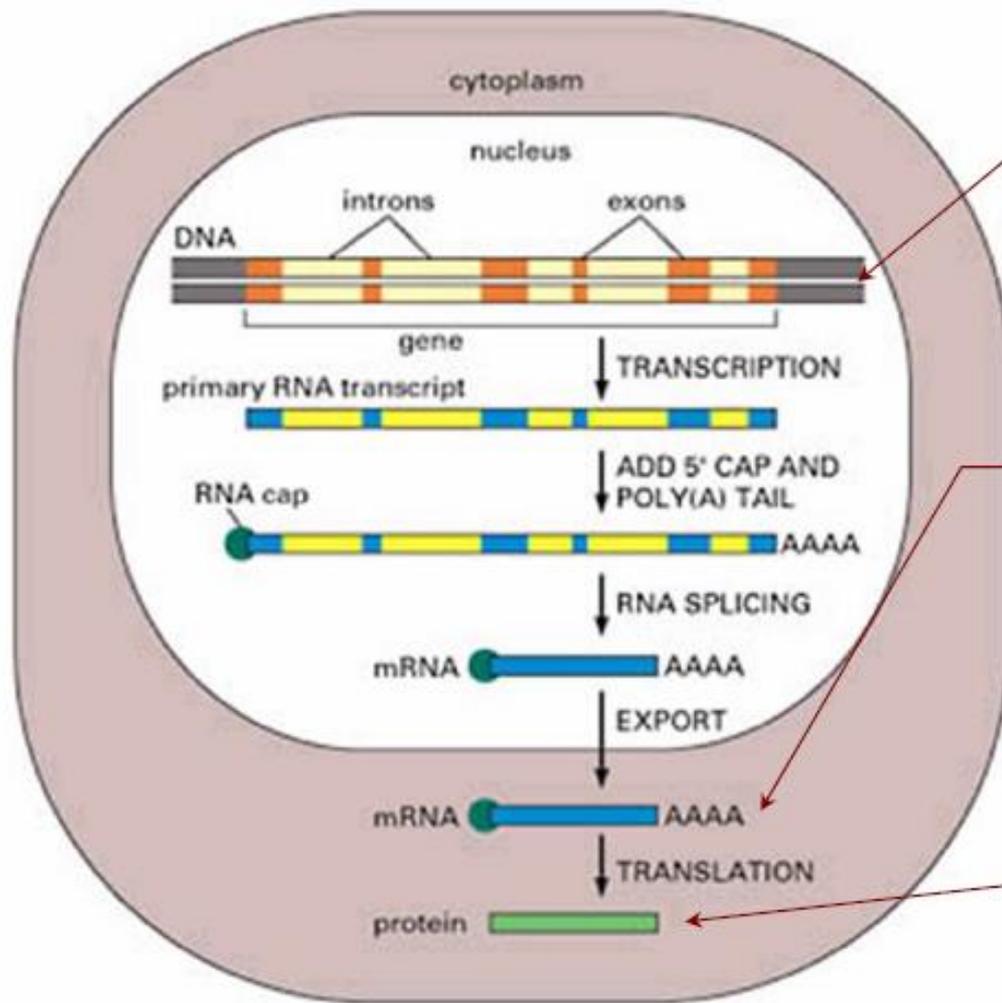
# TIPOS de RNA



# DNA: duplicação, transcrição e tradução



# “OMAS”



## Genoma

Total conjunto de genes de um organismo

## Transcritoma

Conjunto de sequências transcritas (mRNA)

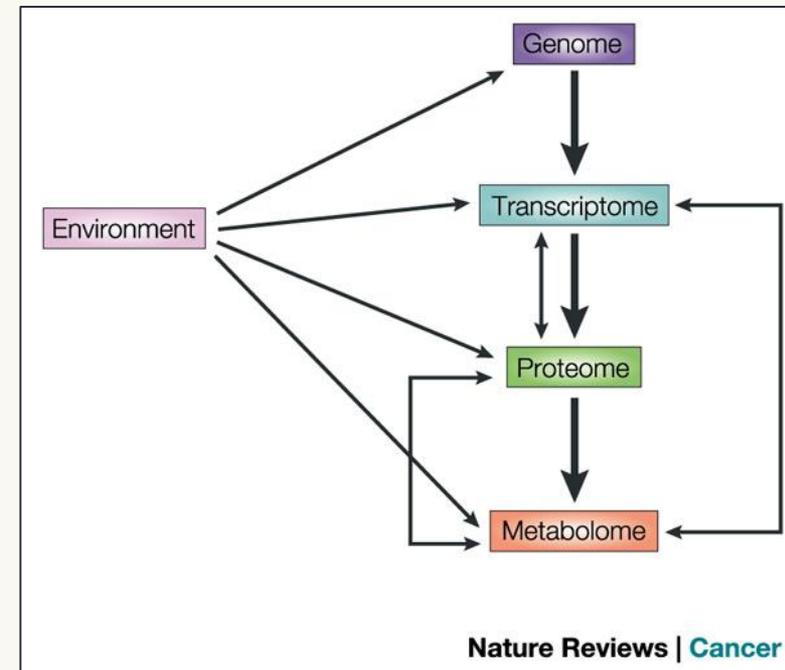
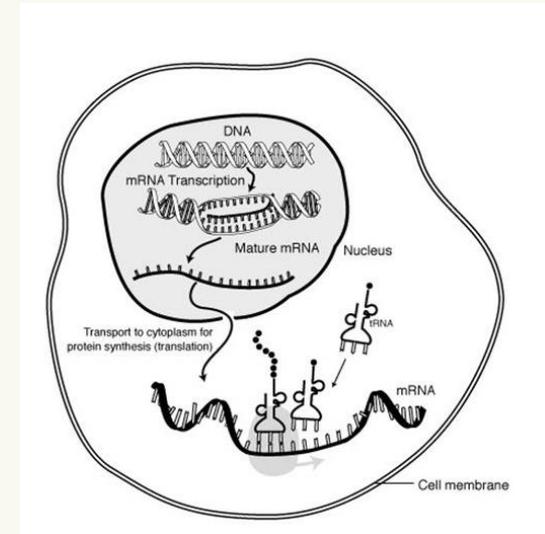
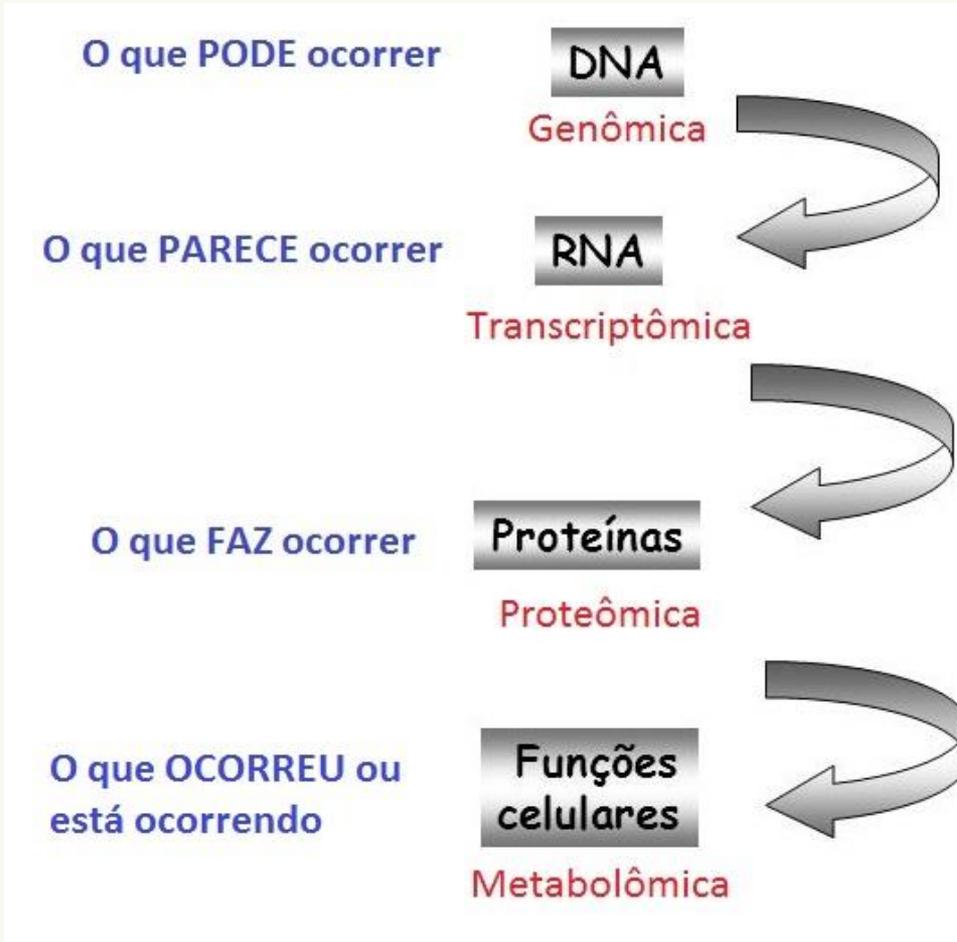
## Proteoma

Conjunto de proteínas codificado pelo genoma

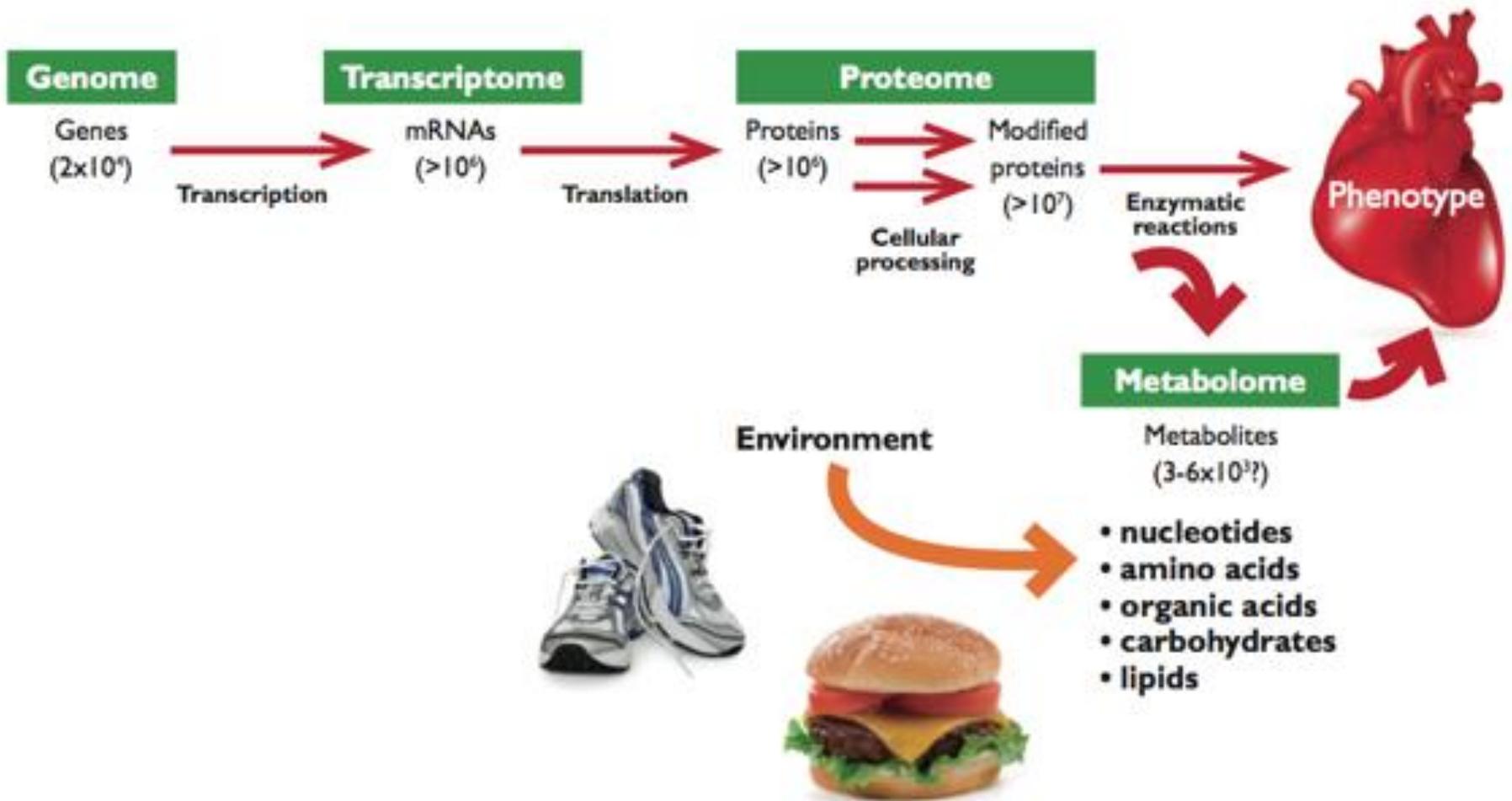
# Descobertas do Projeto Genoma Humano (1990-2003)

-  Contém 3,2 bilhões de nucleotídeos
-  Número estimado de genes é 25 mil
-  Tamanho médio dos genes é de 3.000 bases, mas varia muito
-  A função de cerca de 50% dos genes descobertos é desconhecida
-  A sequência do genoma humano é 99,9% exatamente a mesma em todas as pessoas
-  Somente cerca de 2% do genoma codifica instruções para a síntese de proteínas
-  Sequências repetidas que não codificam proteínas constituem mais do que 50% do genoma humano

# Dogma central da genética e a Cascata “ômica”



# 'OMICS' Technologies



# Aplicações

## DNA

### Genômica

- Exoma-sequencing
- Genoma sequencing
- Karotype and CGHarray

## RNA

### Transcriptômica

- Q-RT\_PCR
- Transcriptome sequencing (RNAseq)
- Microarray

## Proteína

### Proteômica

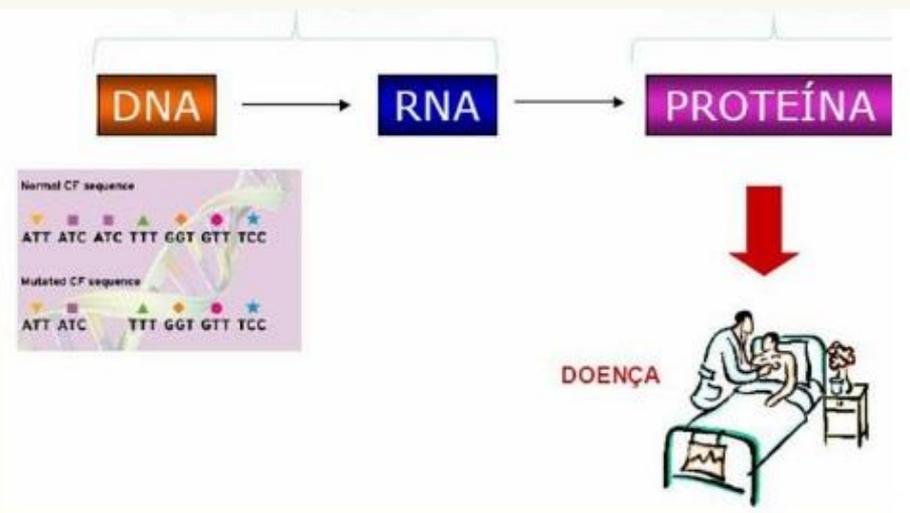
- 2D-PAGE
- LS/MS
- SELDI-TOF (or MALDI-TOF)
- Antibodies Microarray (Ab Microarray)
- Tissue Microarray

# Aplicações

## Diagnósticos Moleculares de Doenças Genéticas

- Muitas doenças são causadas por mutações ou alterações na seqüência do DNA de um gene (doenças monogênicas) ou de vários (doenças poligênicas)

- Com a alteração genética a proteína resultante pode não funcionar corretamente ou não ser formada

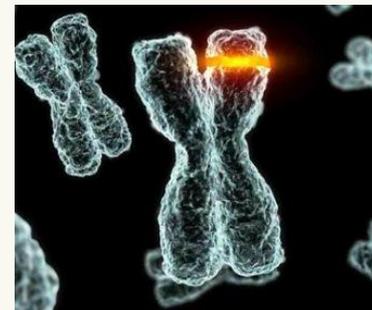


## Testes genéticos para diagnóstico molecular

### ➤ Oncogenética:

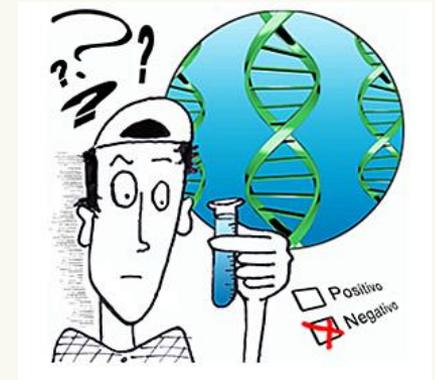
- ❖ Predisposição genética ao câncer (alteração germinativa)
- ❖ Diagnóstico da condição familiar e acompanhamento do indivíduos
- ❖ Direcionamento de tratamento no câncer – drogas específicas

(alteração somática)



## Testes genéticos para diagnóstico molecular

- **Reprodução Humana**
  - ❖ Diagnóstico pré-natal e pré-implantacional / Infertilidade masculina
- **Investigação de doenças neurológicas**
- **Pesquisa de agentes patogênicos**
- **Farmacogenética**
- **Doenças Genéticas e Erros Inatos do Metabolismo**



**Advanced Search :** [OMIM](#), [Clinical Synopses](#), [Gene Map](#)

**Need help? :** [Example Searches](#), [OMIM Search Help](#), [OMIM Tutorial](#)

**Mirror sites :** [us-east.omim.org](http://us-east.omim.org), [europe.omim.org](http://europe.omim.org)



## OMIM

OMIM is a comprehensive, authoritative compendium of human genes and genetic phenotypes that is freely available and updated daily. OMIM is authored and edited at the McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine, under the direction of Dr. Ada Hamosh. Its official home is [omim.org](http://omim.org).

## OMIM Entry Statistics

Number of Entries in OMIM (Updated October 29th, 2015) :

Prefix	Autosomal	X Linked	Y Linked	Mitochondrial	Totals
* Gene description	14,284	702	48	35	15,069
+ Gene and phenotype, combined	82	2	0	2	86
# Phenotype description, molecular basis known	4,242	298	4	29	4,573
% Phenotype description or locus, molecular basis unknown	1,508	129	5	0	1,642
Other, mainly phenotypes with suspected mendelian basis	1,702	112	2	0	1,816
Totals	21,818	1,243	59	66	23,186

## Outras aplicações com uso de material genético

- **Teste de paternidade**
- **Análise forense**
- **Investigação científica**
- **Estudo de processos evolutivos** (filogenias, estudos populacionais)
- **Outros**



# De onde podemos extrair RNA e DNA?

Tecido: congelado/ fresco/ emblocado em parafina

Sangue: soro, plasma, leucócito

Fluido corpóreo: urina, saliva

Células em cultura

Outros

# Aplicações

## Finalidade e tipo de amostra

### ➤ Oncogenética:

- ❖ Teste de Predisposição hereditária - mutação

germinativa - **sangue ou saliva**

- ❖ Teste de mutação para direcionar tratamento - mutação

somática adquirida – **tumor – tecido**



### ➤ Reprodução Humana

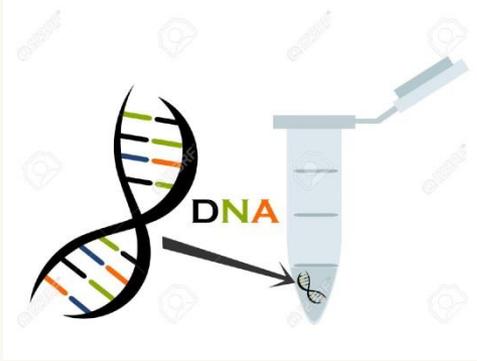
- ❖ Diagnóstico pré-natal não invasivo: **sangue** materno



A preparação da amostra é de extrema importância para identificação das sequências nos ácidos nucleicos (RNA e DNA)

A molécula deve ser eficientemente extraída e purificada, eliminando inibidores que possam atrapalhar o ensaio molecular aplicado.





# Extração dos Ácidos nucleicos



# História do NA

- 1869 – Johann Friedrich Miescher

- Isolou uma substância que continha fósforo e nitrogênio no núcleo da célula: a primeira purificação de DNA da história
- Chamou de “nucleína”
- Publicado com um título nada atraente: “Composição química das células do pus”. Extração de células vindas dos glóbulos brancos em pus de feridas



- 1889 - Richard Altmann

- comprovou que a tal nucleína era um ácido e lhe deu o nome de “ácido nucleico”.

- 1953 - James Watson e Francis Crick

- propuseram o modelo dupla hélice do DNA (publicado na Nature). Ganharam o prêmio Nobel em 1962.



# Os passos básicos envolvidos na extração

## 1. Separação/ Homogeneização da amostra

- Métodos físicos (RNA) ou químicos (DNA)



## 2. Lisar células: remoção de lipídios/ desnaturação proteica

- Remoção da membrana lipídica e restos celulares
- Uso de detergente e centrifugação
- A desnaturação proteica é feita utilizando proteases ou proteinases K

## 3. Remoção do outro NA

- RNase para DNA e DNase para RNA

## 4. Purificação

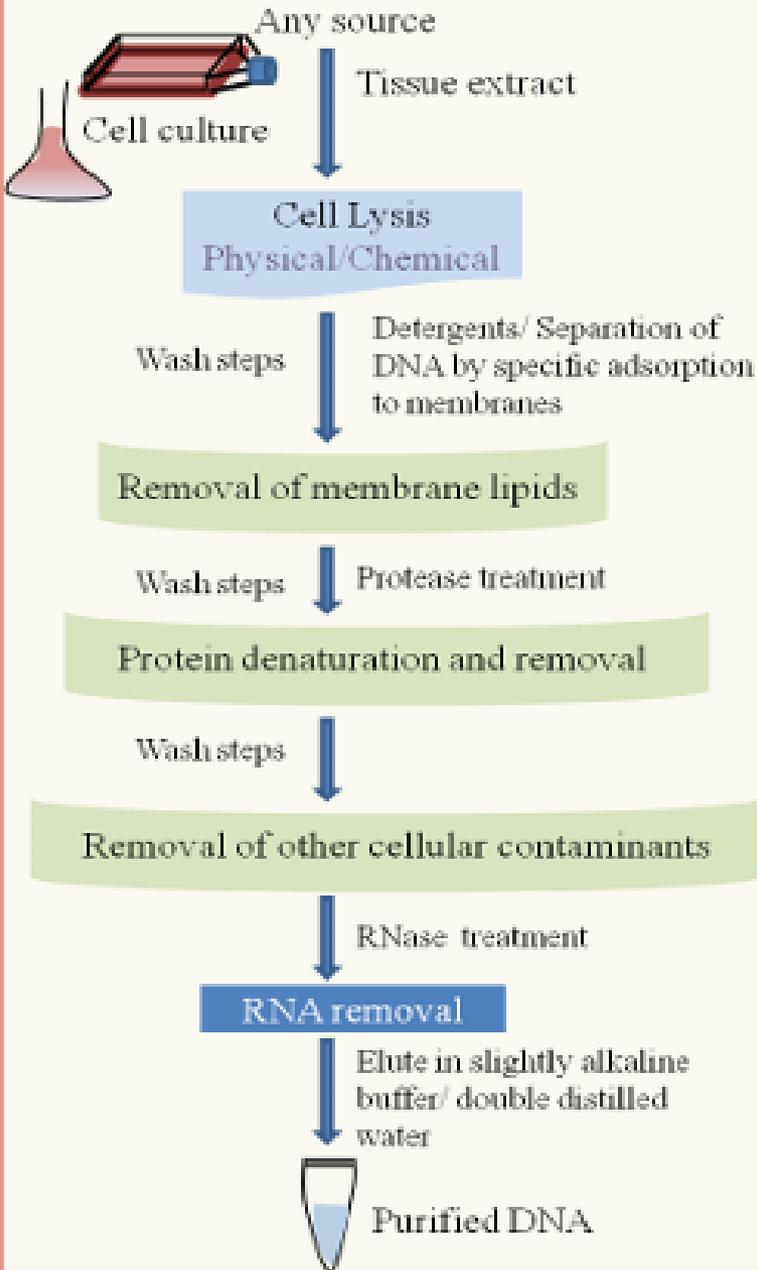
- Remoção de impurezas

## 5. Precipitação/agregação/eluição do NA

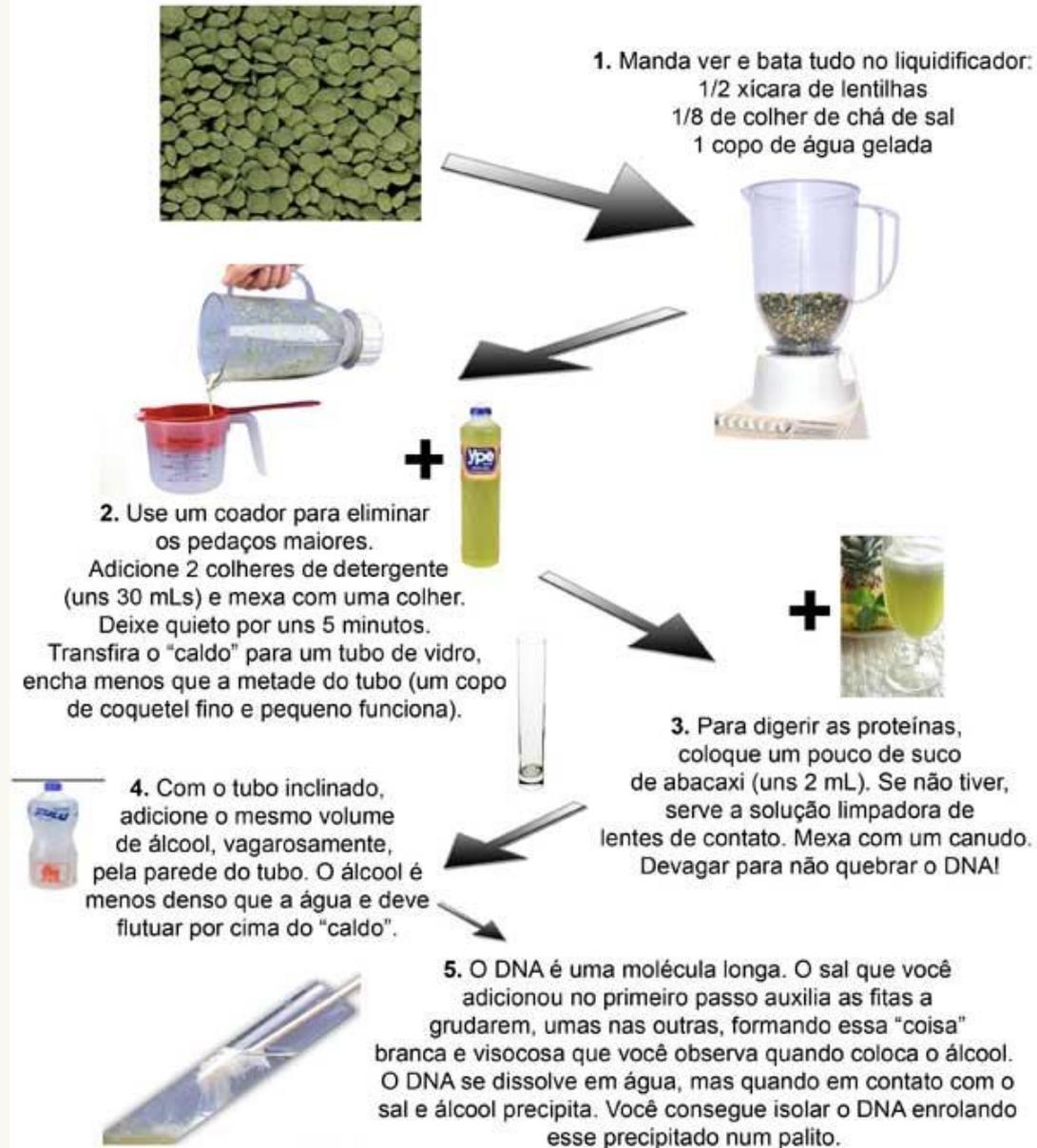
- Etanol / Sais e carreadores/ Eluição em H<sub>2</sub>O ou TE



## DNA extraction



## Como extrair o DNA de qualquer coisa (por exemplo: lentilhas, morangos, etc)



## Existem vários kits comerciais disponíveis para extração e purificação dos NA

A escolha do kit correto é crucial para aperfeiçoar a execução do experimento

Os fatores que precisam ser considerados ao escolher o melhor kit :

- ❖ **Origem da amostra:** Sangue (Plasma, leucócito), tecido congelado/ fresco/ embebido em parafina (FFPE), fluidos corporais (urina, saliva), amostras clínicas (biopsias, aspirados), amostras forenses, etc
- ❖ **Preparação antes da extração:** FFPE (punch/ scrape/ direto), células fixadas em etanol, saliva (Oragene®), urina, separação dos componentes do sangue, etc...
- ❖ **Intenção de uso:** a **qualidade e pureza** do NA deve ser compatível com a futura aplicação downstream

## Os fatores que precisam ser considerados ao escolher o melhor kit :

- ❖ **Quantidade inicial disponível da amostra:** amostra inteira de sangue & mancha de sangue. LCM. Numero de células em culturas ( $10^5$ - $10^7$ ), miligramas de tecido - biópsia, quantidade de sangue (100  $\mu$ l para 1 ml), etc
- ❖ **Rendimento obtido:** Diagnóstico & Biobanco
- ❖ **Simplicidade e flexibilidade:** experiência do profissional
- ❖ **Habilidade em automatizar:** contaminação cruzada



Maxwell  
Promega



KingFisher  
Thermo Scientific



QIASymphony  
Qiagen



Hamilton



MagNA Pure  
ROCHE

# Métodos automatizados

**Table 2. Available automated methods for processing several types of samples.**

Automated method	Sample flexibility	Lysis	Optional external mechanical lysis	NA	Isolation method	Sample size	Batch size	Time (min)
Small lab automation, good options for sample flexibility, ranked according to sample versatility, and performance								
NucliSens easyMAG (bioMérieux)	Many, including blood, swabs, and sputum	Chemical	Yes	DNA RNA	Silica paramagnetic bead binding	<1 mL ( $\approx$ 10-fold)	24	40-60
MagNA Pure Systems (Roche)	Many, including blood and tissue	Chemical enzymatic	MagNA Lyser	DNA RNA	Silica paramagnetic bead binding	$\leq$ 1 mL ( $\approx$ 10-fold)	8, 32 or 96	20-180
QIAcube (Qiagen)	Many, using several Qiagen kits. Flexible	Chemical enzymatic	Tissue Lyser	DNA RNA	Silica spin-column binding (centrifugation)	Kit dependent	12	
EZ1 (Qiagen)	Many, including blood, swabs, tissue, and forensic samples	Chemical	Tissue Lyser	DNA RNA	Silica paramagnetic bead binding No alcohols	0.35 mL (2-3-fold)	6 or 14	Varies
Maxwell (Promega)	Blood, cells, and tissue	Chemical enzymatic		DNA RNA	Cellulose paramagnetic bead binding Ethanol wash	$\leq$ 0.3 mL ( $\approx$ 6-fold)	16	20-40
Large lab automation, good option for large batch sizes								
QIAasymphony (Qiagen)	Many, including swabs and tissue	Chemical	Tissue Lyser	DNA RNA	Paramagnetic bead binding	$\leq$ 1 mL (5-10-fold)	96	
Wizard (Promega)	Cells and Tissue	Enzymatic		DNA	Column plate Vacuum	Cells 0.5 mL	96	20
QIAextractor (Qiagen)	Many, including blood and tissue	Chemical	Tissue Lyser	DNA RNA	Glass fiber plate binding Vacuum	Unknown	96	96
Open platform								
KingFisher (Thermo Sci.)	Flexible	User determined		DNA RNA	Paramagnetic bead binding	User	15, 24, or 96	User
Resource-limited settings								
QuickGene (Kurabo)	Blood, Tissue	Enzymatic		DNA RNA	Porous membrane binding Pressure	0.2 mL	6 or 8	6-20

# Cuidados na extração

## RNA uma molécula instável !!

### Manipulação dos materiais:

- Materiais livres de RNAses:** Estão presentes em vários materiais biológicos, como por exemplo a nossa pele, saliva, etc.
- Água, plásticos, vidros, etc – RNase free**
- Tratamento com DEPC ou RNase away:** inibidores de RNAses
- Uso de luva e máscara**

### Transporte e armazenamento:

- Tecido:** em nitrogênio/ gelo seco/ quando molécula em gelo sempre
- Sangue, saliva:** solução protetora

# Tipos de protocolos de extração

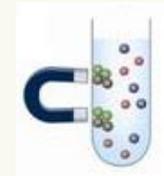
- Extração orgânica: Fenol/clorofórmio ou Trizol



- Tecnologia baseada em sílica: kits de “coluna”



- Separação magnética: beads magnéticos



## Outros:

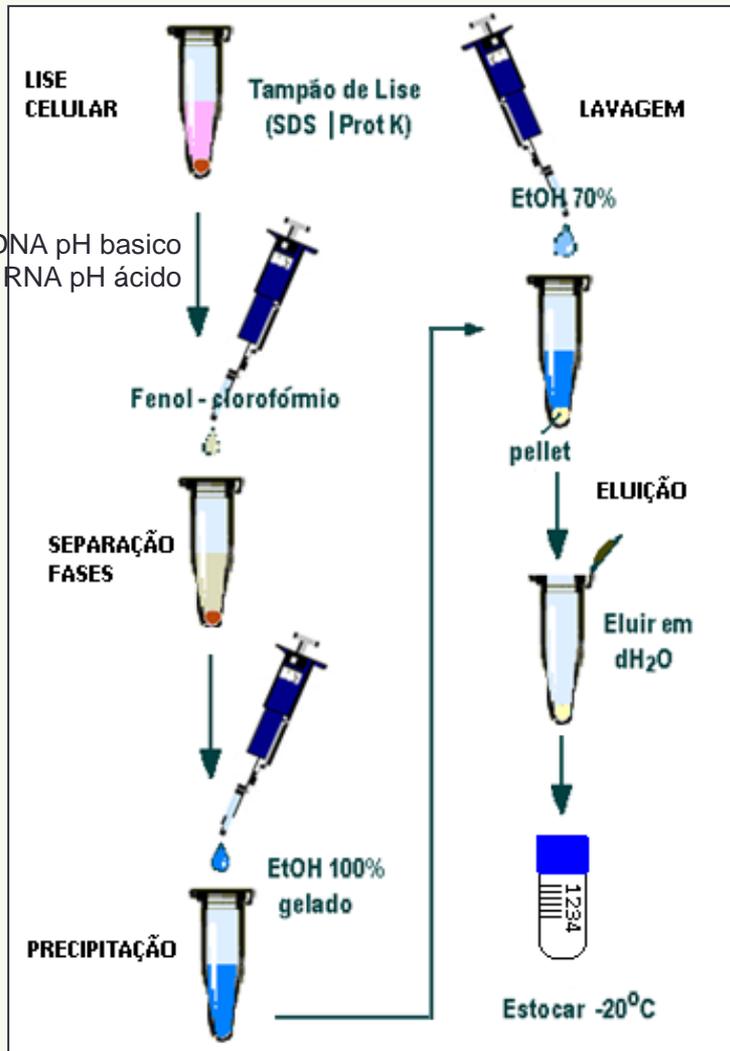
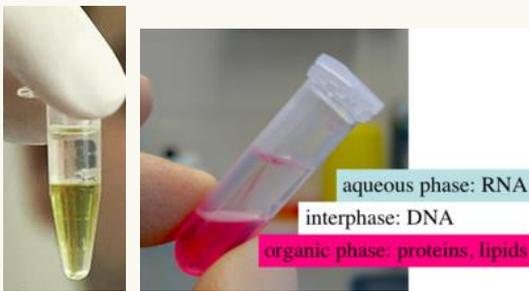
- Tecnologia de troca iônica: isolamento de plasmídeos
- *Salting out*
- Gradiente de densidade por cloreto de céσιο

# Tipos de protocolos

## ➤ Extração orgânica:

### Fenol/clorofórmio(DNA) ou Trizol (RNA)

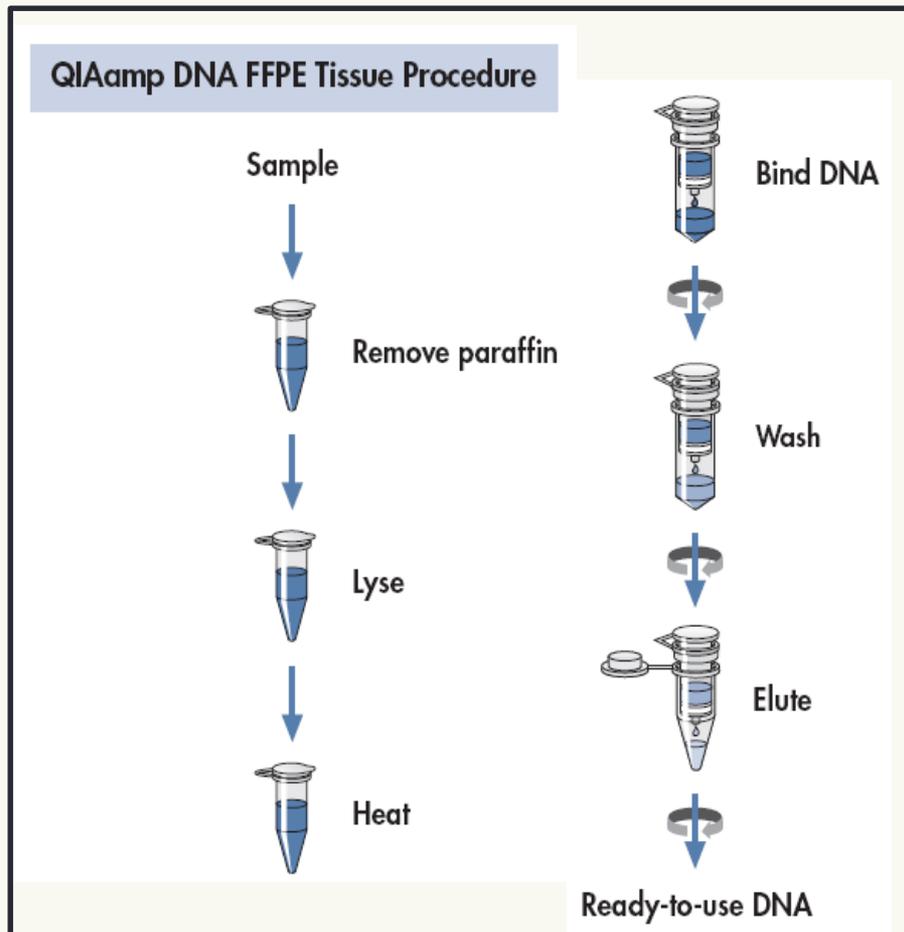
- Amplamente utilizado, método convencional
- **Vantagens:** dificilmente há perda de material, rendimento muito superior aos kits convencionais com qualidade semelhante, RNA total com miRNA
- **Limitações:** toxicidade do fenol, tempo do procedimento, experiência do técnico



# Tipos de protocolos



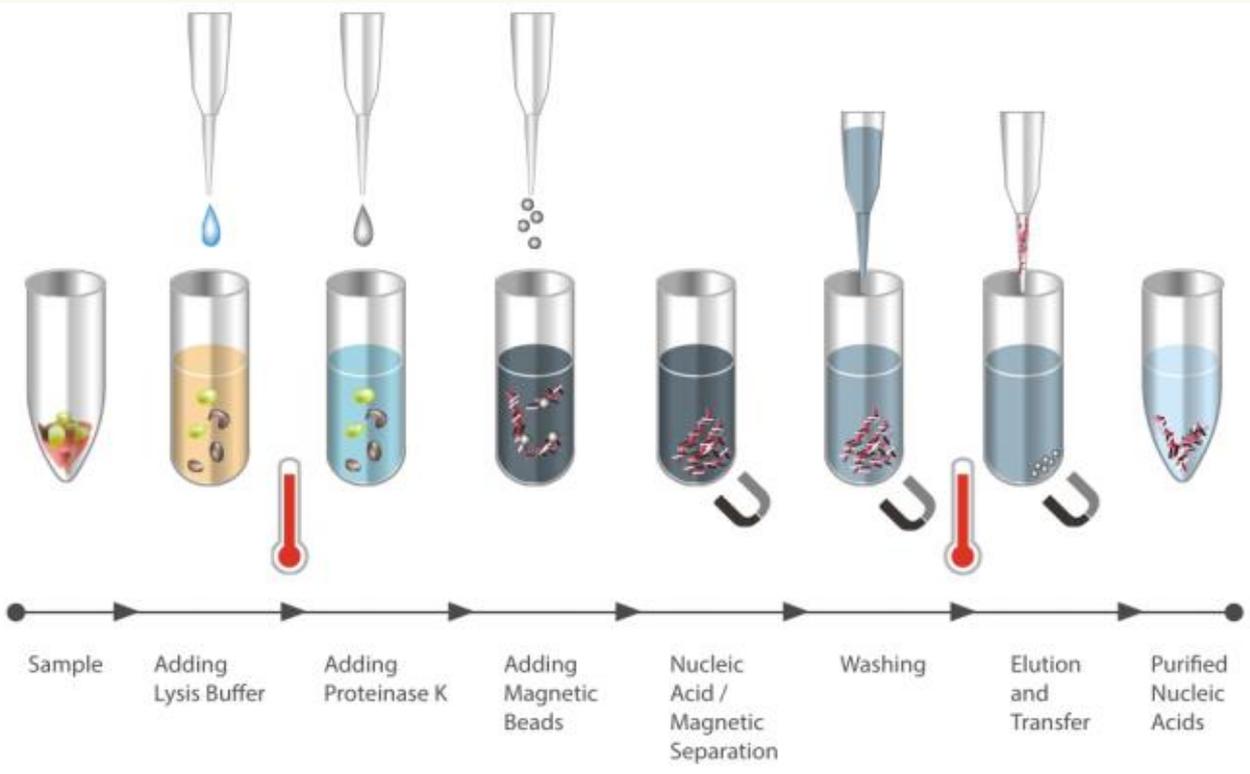
- Tecnologia baseada em sílica: kits de “coluna”



- Muito empregada nos kits atuais
- **Vantagens:** procedimento simples e rápido, permite automação, pode ser feito RNA e DNA simultâneo
- **Limitações:** membrana da coluna pode ocluir perdendo o material, alguns RNA total sem miRNA

# Tipos de extração

## ➤ Separação magnética: beads magnéticos



➤ **Vantagens:** não há uma barreira p/ oclusão da amostra, simples, RNA total com miRNA

➤ **Limitações:** compra do equipamento

➤ Muito empregada nos métodos automatizados

# Avaliação de qualidade

## Qualidade da molécula de RNA e DNA

- ✓ **Pureza** (livre de contaminantes como sais, etanol, lipídeos, polissacarídeos, proteínas, fenol, clorofórmio e outras substâncias)
- ✓ **Rendimento** (em ug)
- ✓ **Integridade** (as moléculas não devem estar fragmentadas)

# Avaliação de qualidade

## PUREZA

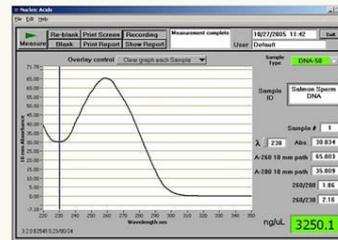
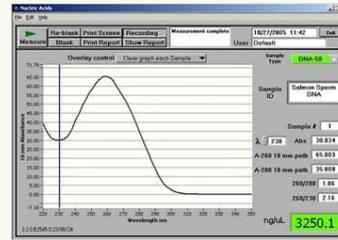


Espectrofotômetro  
NanoDrop ND-1000

RNA



DNA



➤ Nível de pureza do RNA / DNA

- $OD\ 260 / OD\ 280 = 1,8 \sim 2,0$
- $OD\ 260 / OD\ 230 = 1,8 \sim 2,0$

Pico de absorvância do RNA é a 260 nm. Leitura a 260nm = 1.0 equivale a 40 µg RNA/ml

Pico de absorvância do DNA é a 260 nm. Leitura a 260nm = 1.0 equivale a 50 µg DNA/ml

Proteínas 280 nm

Contaminantes 230 nm: sais, polissacarídeos, compostos orgânicos como fenol, etc

# Avaliação de qualidade

## Quantificação



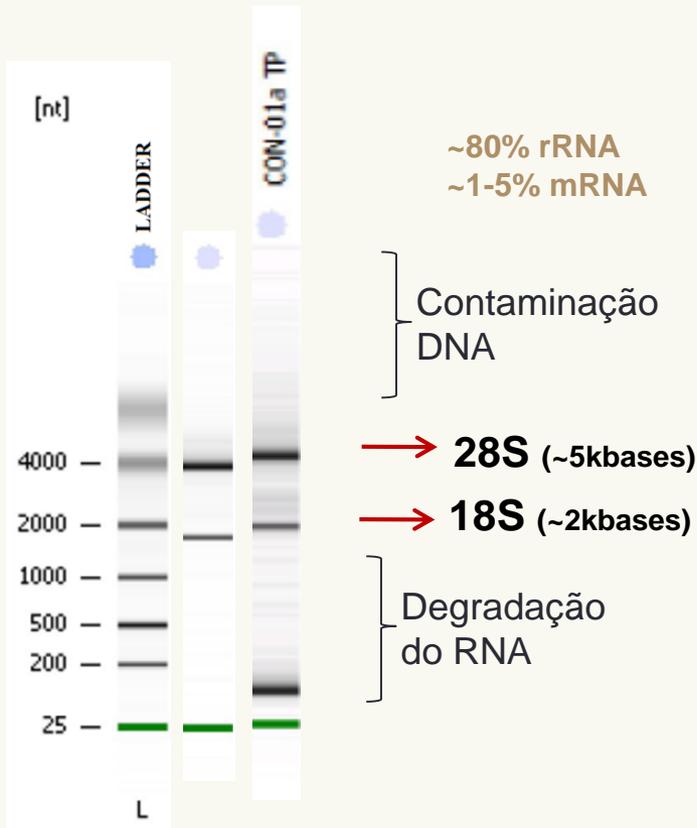
### Qubit® Fluorometer *Life technologies*

corante fluorescente que emite um sinal apenas quando ligado ao alvo, o que minimiza os efeitos de contaminantes

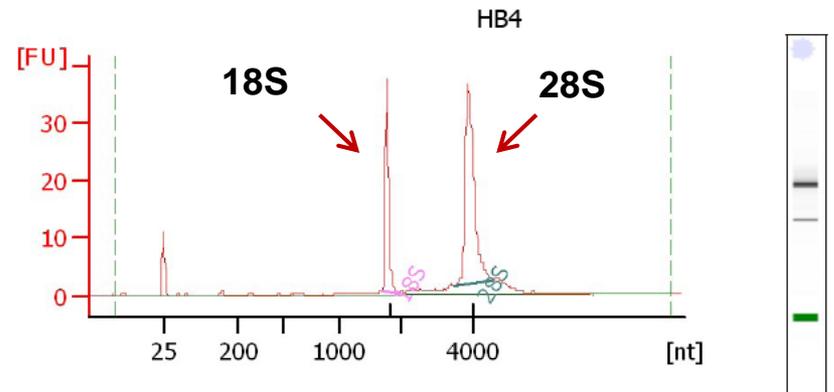
# Avaliação de qualidade

## Integridade do RNA

### Agilent 2100 Bioanalyzer



RIN: RNA integrity number



#### Overall Results for sample 5 : HB4

RNA Area: 126.1  
 RNA Concentration: 70 ng/μl  
 rRNA Ratio [28s / 18s]: 2.0  
 RNA Integrity Number (RIN): 10.0 (B.02.05)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN:10

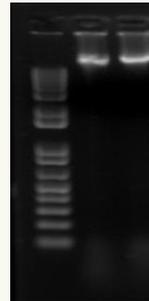
#### Fragment table for sample 5 : HB4

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,713	1,972	30.5	24.2
28S	3,535	4,558	61.9	49.1

# Avaliação de qualidade

## Integridade do DNA

GEL de AGAROSE 0,8%



Banda de alto peso molecular



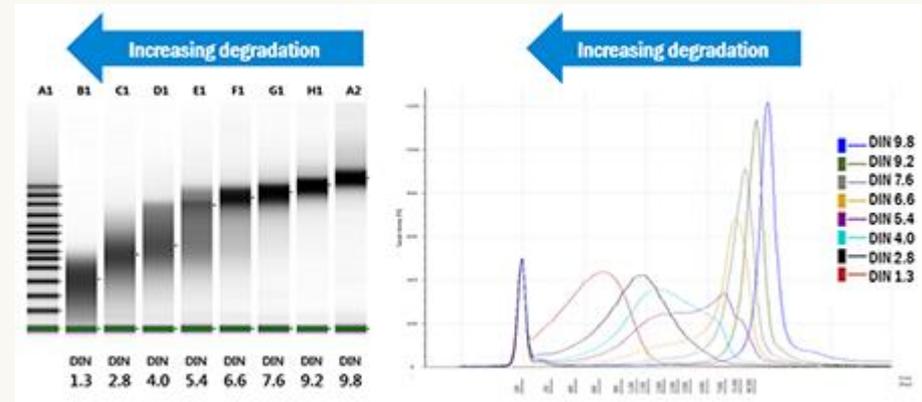
Qualidade do DNA

Excelente  
(Banda única)

Ótimo  
(Banda única com smear)

Bom  
(Smear)

## Agilent 2200 TapeStation

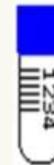
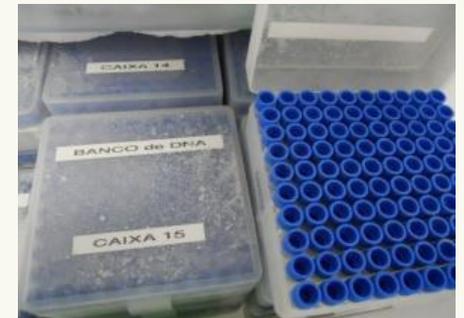


DIN: *DNA integrity number*

# Armazenamento das moléculas

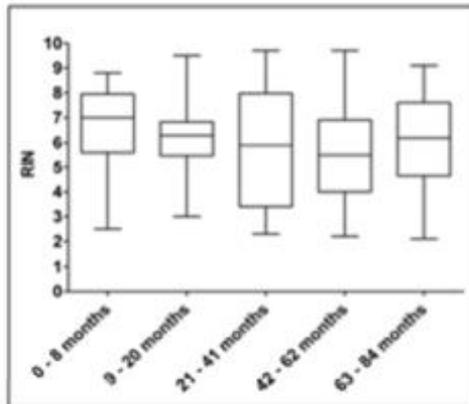
**RNA -80°C**

**DNA -20°C**



## Biobanking Practice: RNA Storage at Low Concentration Affects Integrity

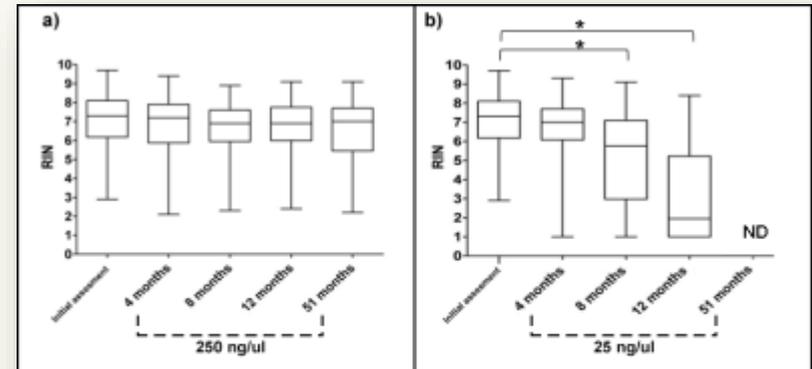
Qualidade do RNA avaliando tecidos armazenados a -140oC por até 7 anos



Period	N	Average (SD)	Median
0-8 months	37	6.6 (1.6)	7.0
9-20 months	34	6.1 (1.4)	6.3
21-41 months	30	5.9 (2.4)	5.9
42-62 months	43	5.5 (1.9)	5.5
63-84 months	45	6.0 (2.0)	6.2

Não houve diferença do RIN

Qualidade do RNA armazenado a -80oC por até 4 anos (nas concentrações 250 e 25 ng/ul)



Periods of storage	RIN value at 250 ng/ul		RIN value at 25 ng/ul	
	Average (SD)	Median	Average (SD)	Median
initial assessment	7.1 (1.6)	7.3	7.1 (1.6)	7.3
4 months	6.7 (1.6)	7.2	6.5 (1.9)	7.0
8 months	6.6 (1.5)	6.9	5.2 (2.4)	5.8
12 months	6.6 (1.6)	6.9	3.0 (2.5)	2.0
51 months	6.4 (1.8)	7.0	ND	ND

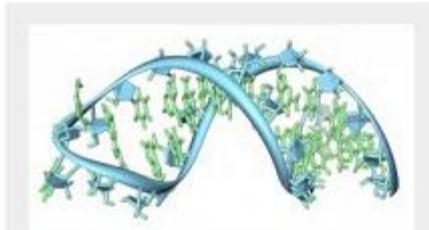
RNA preservado a 250 ng/ul  
 Degradação significativa a 25 ng/ul

## How Time and Concentration Affect Biobanking of RNA



0 Followers

— Brian Mossop · April 1, 2014 · Cryopreservation, Featured · No Comment



— Artist representation of RNA. Flickr / ucimaps

One of the biggest challenges in maintaining an RNA biobanking system is keeping the notoriously delicate molecules intact while frozen during cryopreservation. Two of the variables in a long-term storage protocol are the length of time the tissues remain frozen, and the concentration of the molecule in the sample. A new study<sup>[1]</sup> from an international group of researchers addresses these variables, which have been underreported in previous work.

RNA is often stored within tissue samples in biobanking facilities. However, researchers debate the exact freezing temperature for optimal cryopreservation. Though the WHO-IARC and the AC Camargo

Biobank (ACCB) suggest keeping tissues stored below  $-130^{\circ}\text{C}$ , many facilities are using  $-80^{\circ}\text{C}$  as the mark. Studies looking into the long-term storage (about 7 years) of RNA in tissue have had mixed results, presumably due to the variation in freezing temperatures. The authors found that, within samples from their facility, storing samples at  $-140^{\circ}\text{C}$  kept the RNA intact and useable over the same period of time.

When freezing RNA that's dissolved in solution, the standards mandate keeping the temperature at  $-80^{\circ}\text{C}$ . To investigate whether the concentration of RNA had any effect on cryopreservation, the researchers stored samples at concentrations of either 250 ng/mL or 25 ng/mL. Their results showed rapid degradation of the molecules in the less concentrated solution at

### Subscribe

Your email:

### Featured Posts



**Will GMP Compliance Necessitate Standardized Cell Thawing?**

June 4, 2015



**ThawSTAR Cell Thawing System Featured in BioProcess Publication**

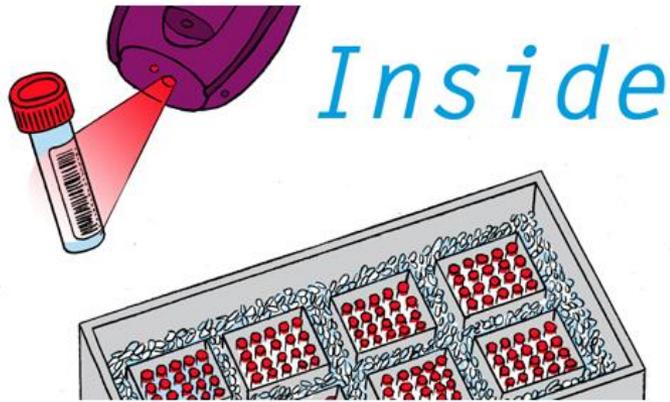
May 19, 2015



**Watch the ThawSTAR Video: Reproducible Cell Thawing**

May 14, 2015

### Protocols



Biobanking » Storage and Transport » Maintaining RNA Integrity...

## Maintaining RNA Integrity During Cold Storage

By **Kiara Biagioni** on June 4, 2015

Download as PDF 



Researchers often turn to biobanked samples for cancer biology experiments. Since 2004, the A.C. Camargo Cancer Center Biobank has stored more than 12,000 whole blood samples. From those blood samples, past researchers have isolated 6,000 RNA and 9,500 DNA samples and distributed more than 24,000 aliquots. These samples are highly useful for investigations involving the transcriptome; however, future

### ACCELERATING SCIENCE

#### BIOBANKING

- » Collection (21)
- » Preparation (10)
- » Sample Analysis (7)
- » Storage and Transport (38)
- » Management (25)
- » Case Studies (39)

#### FOLLOW US



#### Reference

1. Olivieri, E.H.R. et al. (2014) "Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity," *Biopreservation and Biobanking*, 12(1) (pp. 46–52), doi: 10.1089/bio.2013.0056

# Obrigada!!!

