

eP1931

Avaliação da qualidade e eficiência do DNA extraído de sangue impregnado em papel filtro para uso no diagnóstico molecular de doenças lisossômicas

Diana Elizabeth Rojas Málaga, Rowena Rubim Silva do Couto, Franciele Barbosa Trapp, Ana Carolina Brusius-Facchin, Sandra Leistner-Segal, Roberto Giugliani - HCPA

A implementação de um método de extração de DNA eficiente e custo-efetivo é fundamental para o diagnóstico molecular de doenças genéticas, especialmente num laboratório assistencial. O material utilizado para a extração varia desde sangue periférico, sangue impregnado em papel filtro, células de mucosa oral, etc. O sangue impregnado em papel filtro (SIPF) é um material de fácil coleta e que pode ser armazenado por longos períodos além de ser de fácil transporte entre laboratórios. Existem vários protocolos disponíveis para a extração e purificação de DNA a partir deste tipo de material, tanto in-house como comerciais. O objetivo deste estudo foi estabelecer um método eficiente para a extração de DNA a partir de SIPF e comparar seu desempenho em diferentes métodos de biologia molecular. Para isto foram utilizados 4 picotes (3-mm) de SIPF de pacientes com diagnóstico molecular prévio e material disponível no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foi testado um kit comercial: PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) e três protocolos in-house: "Tris-EDTA", "CASM" (ambos de tratamento térmico) e "fenol-clorofórmio". A qualidade, pureza e concentração de DNA foram comparadas e o desempenho foi avaliado utilizando PCR convencional (200-900pb), PCR-RFLP, PCR em tempo real (TaqMan® SNP Genotyping Assay), sequenciamento pelo método de Sanger (200-500pb) e sequenciamento de nova geração (na plataforma Ion Torrent PGM, painel de genes com 72, 118 e 153 amplicons). O método de fenol-clorofórmio foi o que apresentou melhores resultados, com desempenho similar ao obtido com DNA extraído de sangue periférico. Este método demonstrou a sua efetividade com volumes pequenos de DNA e compatível com futuras aplicações downstream. Palavras-chaves: sangue impregnado em papel filtro, método de extração de DNA, diagnóstico molecular