

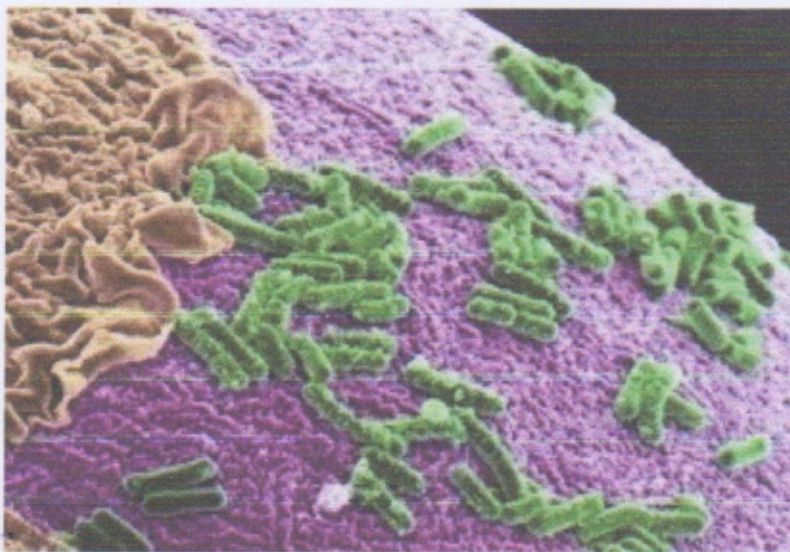
Caderno de Anotação

Microbioma Hospitalar

Ciências Biomédicas - FMRP/USP

Biotecnologia III

RCB-0300 - 2020



Grupo 4

guilherme
Isabela
luana
maria vitória
Rafaela

Título do projeto: **MICROBIOMA HOSPITALAR**

Data: 04/03/2020

Página Nº. 01

* Coleta e extração de material no HEMOCENTRO na segunda-feira (04/03)

* Distribuição de tarefas:

- Guilherme: extração
- Isabela: planilhas
- Luana: tirar fotos
- Maria Vitória: anotações
- Rafaela: coleta

Continua na página:

Responsável:

Maria Vitória Oliveira

Data:

04/03/2020

Supervisor:

Data:

Título do projeto:		Data: 09/03/20	
Continua da página N°.:		Página N°.:	

	<u>Solução estabilizadora</u>	<u>Solução mãe</u>
TRIS	(10 mM)	1 M
EDTA	(10 mM)	0,5 M
NaCl	(100 mM)	5 M
SDS	0,5 %	10 %
Proteína K	(0,1 mg / μ L)	20 μ g / μ L
QSP	10 mL	

TRIS

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$1 \cdot V_1 = 10 \cdot 10^{-3} \cdot 10$$

$$V_1 = 0,1 \text{ mL} \rightarrow 100 \mu\text{L}$$

SDS

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$10 \cdot V_1 = 0,5 \cdot 10$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL} \rightarrow 500 \mu\text{L}$$

NaCl

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$5 \cdot V_1 = 100 \cdot 10^{-3} \cdot 10$$

$$V_1 = 0,2 \text{ mL} \rightarrow 200 \mu\text{L}$$

EDTA

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$$

$$0,5 \cdot V_1 = 10 \cdot 10^{-3} \cdot 10$$

$$V_1 = 0,2 \text{ mL} \rightarrow 200 \mu\text{L}$$

Proteína K

$$20 \mu\text{g} \cdot x = 0,1 \cdot 10$$

$$x = \frac{1}{20} \cdot x = 0,05 \text{ mL}$$

$$\rightarrow 50 \mu\text{L}$$

H₂O

0,10	
0,20	
0,50	
0,20	
0,05	
1,05	

<u>Piloto da extração</u>		
HEMOCENTRO		
ID	Local	
Grupo 4	GP04 - 090320 - INHEHS	Hall das salas de aula
<u>Descrição</u>		

* Preparo do tubo A e B $\rightarrow$ 1 mL da solução estabilizadora em cada tubo

* coleta das amostras na magneta, cadeiras, mesas e bebedouros

* OBS: Foi coletado 500 μ L no tubo B pois estava quase sem solução. Isso pode alterar a concentração de DNA do tubo.

* 10 tubos (37-46)

Continua na página N°.:	
Responsável:	Data:
Supervisor:	Data:

Resumo do protocolo de extração

- 1- Adicionar 500 µL da amostra nos POWER BEAD TUBES
- 2 Vortexar gentilmente
- 3 Se a solução C1 estiver precipitada aquecer a 60 °C até que dissolva
- 4 Adicione 60 µL de solução C1 na amostra. Vortexar brevemente
- 5 Prender os tubos POWER BEAD horizontalmente usando o adaptador MO BIO vortex para o equipamento. Vortexar em velocidade máxima por 10 minutos
- 6 Centrifugar os tubos a 10,000 xg por 30 segundos a temperatura ambiente
- 7 Transferir o sobrenadante para um COLLECTION TUBE limpo
- 8 Adicionar 250 µL de solução C2 e vortexar por 5 segundos. Incubar por 5 minutos à 4 °C
- 9 Centrifugar os tubos a 10,000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente
- 10 Transferir todo o volume do sobrenadante para um 2 ml COLLECTION TUBE limpo, evitando o pellet.
- 11 Adicionar 200 µL de solução C3 e vortexar brevemente. Incubar por 5 minutos à 4 °C
- 12 Centrifugar todos os tubos na temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 xg
- 13 Transferir todo o volume do sobrenadante para um 2ml COLLECTION TUBE limpo, evitando o pellet
- 14 Misturar a solução C4 antes de usar. Adicione 1200 µL da solução C4 ao sobrenadante e vortexar por 5 segundos.
- 15 Adicione aproximadamente 675 µL no SPIN FILTER e centrifugue a 10,000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente. Descarte o que passou e adicione mais 675 µL de sobrenadante no SPIN FILTER e centrifugue novamente a 10,000 xg por 1 minuto na temperatura ambiente. Coloque o restante do sobrenadante no SPIN FILTER e centrifugue a 10,000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente.
- 16 Adicione 500 µL da solução C5 e centrifugue a 10,000 xg por 30 segundos a temperatura ambiente.
- 17 Descarte o que passou
- 18 Centrifugue de novo a 10,000 xg por 1 minuto a temp. ambiente
- 19 Coloque cuidadosamente o SPIN FILTER num 2ml COLLECTION TUBE
- 20 Adicione 50 µL da solução C6 no orifício do filtro
- 21 Centrifugue a 10,000 xg por 30 segundos a temperatura ambiente
- 22 Descarte o SPIN FILTER

Continua na página N°.:

Responsável:

Data:

Supervisor:

Data: