



INCT Fungos do Brasil

POP 1: Extração, análise de qualidade e envio de DNA

Manual do Usuário

Objetivo: Orientar os pesquisadores da rede INCT Fungos do Brasil sobre os procedimentos de extração, purificação e os critérios mínimos de qualidade e quantidade para o envio de amostras de DNA genômico destinadas ao sequenciamento (*PCR-free library prep. Illumina*).

1. Verificação da Pureza das Culturas

ATENÇÃO: Este é um passo importante antes de qualquer extração de DNA. O sequenciamento genômico é extremamente sensível e detectará qualquer contaminante presente na cultura. Um genoma contaminado com DNA de outro microrganismo (bactéria, levedura ou outro fungo) compromete completamente a montagem e a análise, resultando em desperdício de recursos e necessidade de resequenciamento.

1.1. Obtenção de culturas monospóricas (Fortemente Recomendado)

Para garantir a pureza genética da amostra, é **fortemente recomendado** que o DNA seja extraído a partir de **culturas monospóricas** (derivadas de um único esporo). Esse procedimento assegura que todo o material genético pertence a um único indivíduo, eliminando a possibilidade de mistura de genótipos distintos — mesmo dentro da mesma espécie. Culturas originadas de fragmentos de micélio ou de múltiplos esporos podem conter variantes genéticas que dificultam a montagem do genoma.

1.2. Checagem visual e microbiológica antes da extração

Antes de iniciar a extração de DNA, o pesquisador deve realizar uma inspeção rigorosa da cultura:

Tipo de Cultivo	O que verificar	Sinais de Contaminação (NÃO extrair)
Meio Sólido (Placa)	Colônia uniforme em morfologia, cor e textura. Ausência de colônias satélites ou zonas com aspecto diferente.	Colônias bacterianas (pontos brilhantes, mucoides); crescimento de outro fungo com morfologia distinta; bordas irregulares com coloração diferente.
Meio Líquido (Caldo)	Crescimento micelial homogêneo (pellets ou tapete). Meio claro entre as massas miceliais.	Turbidez do meio (indicativo clássico de contaminação bacteriana); biofilme na superfície; mudança de cor ou odor atípico do meio; presença de estruturas diferentes do esperado.

1.3. Procedimentos em Caso de Suspeita de Contaminação

Se houver qualquer suspeita de contaminação, o pesquisador **não deve prosseguir** com a extração de DNA. As seguintes ações são recomendadas:

1. Repicar a cultura em meio novo a partir de uma região aparentemente pura (ponta de hifa).
2. Realizar nova cultura monospórica a partir de esporos isolados.
3. Caso o fungo não esporule, realizar diluição seriada de fragmentos de hifa e replaqueamento.
4. Após obter uma nova cultura limpa, aguardar o crescimento completo e repetir a checagem visual antes de extrair.

1.4. Confirmação Opcional por Microscopia

Para maior segurança, recomenda-se observar uma pequena porção da cultura em microscópio óptico (aumento de 400x a 1000x) para confirmar a ausência de células bacterianas (bastonetes ou cocos) entre as hifas fúngicas.

2. Diretrizes para extração de DNA

A obtenção de DNA de qualidade molecular (alto peso molecular, íntegro) é o segundo passo mais crítico para o sucesso do sequenciamento genômico. Os pesquisadores devem adotar

protocolos rigorosos para garantir a integridade e pureza do material.

Método de Extração: Não exigimos um kit ou protocolo comercial específico, mas o pesquisador **deve informar obrigatoriamente** o método utilizado na planilha de envio (ex: *CTAB*, *Kit Qiagen DNeasy Plant*, *Kit Zymo Research*, fenol-clorofórmio, etc.). Isso auxilia na identificação de possíveis inibidores residuais caso haja falha no sequenciamento.

Recomendações Gerais para Extração:

Aspecto	Recomendação
Material de partida	Utilize culturas jovens (3-7 dias para a maioria dos fungos filamentosos) e saudáveis para minimizar a presença de metabólitos secundários e polissacarídeos.
Lise celular	Evite o excesso de agitação mecânica (vortex) prolongada durante a lise para não fragmentar o DNA. Prefira maceração com nitrogênio líquido ou beads com pulsos curtos.
Fungos melanizados	Para fungos melanizados ou ricos em polissacarídeos, considere etapas adicionais de purificação (ex: precipitação com CTAB/NaCl ou uso de colunas de purificação adicionais).
RNase	Trate com RNase A para eliminar RNA, que pode interferir na quantificação e na preparação da biblioteca.
Armazenamento pós-extração	Armazene o DNA a -20 °C (curto prazo) ou -80 °C (longo prazo). Evite ciclos de congelamento/descongelamento repetidos.

3. Condições Mínimas de Qualidade e Quantidade do DNA

Para que a amostra seja aceita pelo Comitê e enviada à facility nos EUA, ela deve cumprir **estritamente** os seguintes parâmetros:

Parâmetro	Requisito Mínimo	Observações
Quantidade de DNA	≥ 500 ng (total)	Necessário para preparo de biblioteca PCR-free.
Concentração Mínima	≥ 10 ng/ μ L	Recomendamos enviar mais concentrado se possível.
Volume da Amostra	20 μ L a 50 μ L	-
Tampão de Suspensão	Água ultrapura ou Tampão LIVRE DE EDTA	Proibido o uso de tampão TE padrão. O EDTA inibe reações enzimáticas subsequentes.
Pureza (Razão 260/280)	Entre 1.6 e 2.0	Medido via NanoDrop ou espectrofotômetro similar.
Pureza (Razão 260/230)	≥ 1.8	Medido via NanoDrop. Valores baixos indicam contaminação por carboidratos, sais ou fenol.
Integridade (Tamanho)	$> 50\%$ dos fragmentos maiores que 2 kb	Verificado por Gel de Agarose (0.8% a 1%) ou Bioanalyzer/TapeStation. O DNA não pode estar severamente degradado/arrastado no gel.
Quantificação Oficial	Ensaio Fluorométrico (ex: Qubit)	A quantificação final informada na planilha deve ser feita por fluorometria. O NanoDrop superestima a concentração de DNA.

4. Instruções para acondicionamento local

As amostras devem ser armazenadas em microtubos de 1.5 mL ou 2.0 mL estéreis, livres de DNase e RNase. Os tubos devem ser claramente identificados no topo e na lateral com o **Código da Amostra** (conforme registrado na planilha de envio), utilizando caneta permanente resistente a álcool e congelamento. As amostras devem ser mantidas a -20 °C (ou -80 °C) até o momento do envio para o Ponto Focal/Hub Regional.

5. Como Proceder se o Laboratório não possuir Qubit ou NanoDrop?

O INCT Fungos do Brasil opera em rede. Caso o seu laboratório não possua infraestrutura para quantificação fluorométrica (Qubit) ou avaliação de pureza (NanoDrop), siga o **Plano de Logística Nacional**. Você deverá extrair o DNA, realizar a verificação inicial em gel de agarose e enviar a amostra para o seu **Hub Regional de Apoio** para a validação final de qualidade antes do envio ao Ponto Focal.

6. Documentação Necessária

Toda amostra deve ser acompanhada do preenchimento da **Planilha 1: Envio de Amostras de DNA**. Esta planilha deve ser enviada digitalmente ao Comitê e uma cópia impressa deve acompanhar o pacote físico.

