EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Aula prática 5

LGN0114 – Biologia Celular

Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

Entrega do relatório dos modelos celulares deve ocorrer na próxima semana!!!

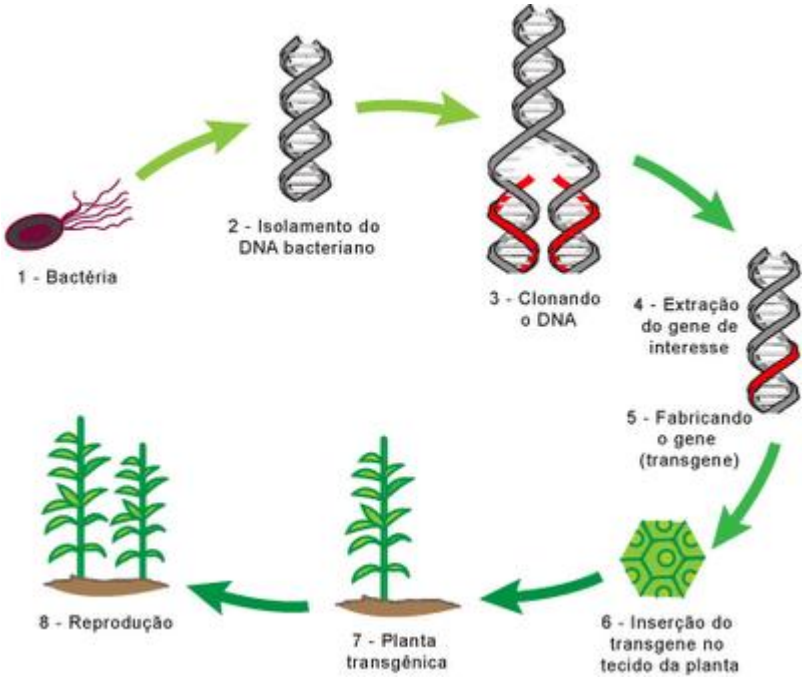
EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Rompimento da célula

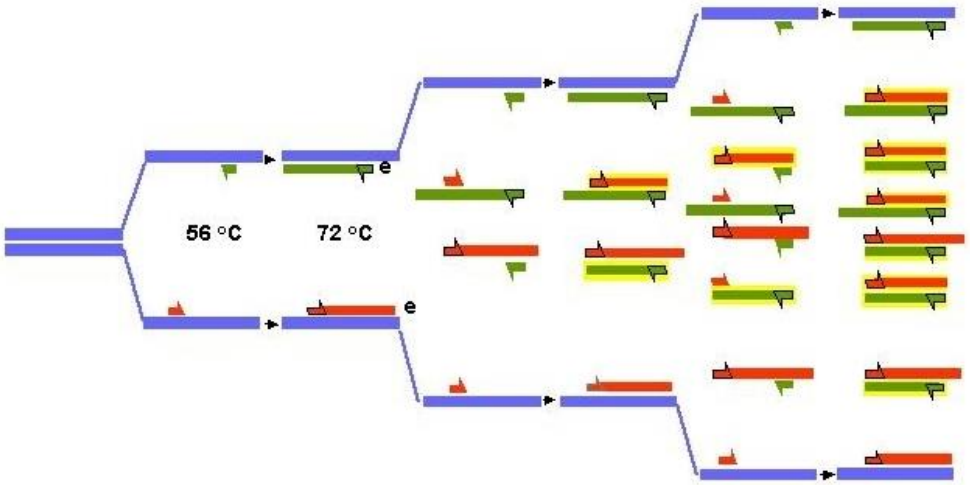
✓A Biologia Molecular e a Engenharia Genética baseiam-se em técnicas de extração, análise e manipulação de ácidos nucleicos.

✓Por meio de sequências de DNA podemos estudar todos os tipos de organismos (alguns vírus, bactérias, plantas e animais).

Estudos evolutivos



Obtenção de OGMs



Diagnose de doenças

INICIALMENTE PRECISAMOS DO DNA EXTRAÍDO!

EXTRAÇÃO DE DNA DE PLANTAS

- ✓ Toda extração de DNA se baseia em 4 etapas básicas, presentes em qualquer protocolo de extração:

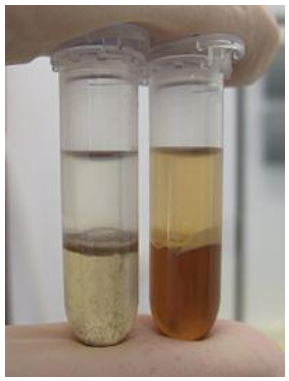
1. Lise das membranas lipídicas;
2. Purificação do DNA;
3. Precipitação do DNA;
4. Reidratação do DNA.

Folhas (350 mg)

Cortar e transferir para o almofariz (cadinho)

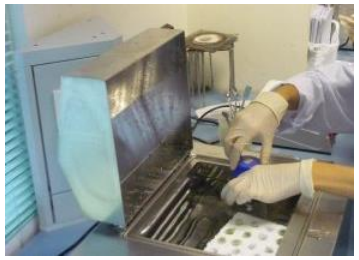
Macerar com N_2 líquido

Adicionar 1,0 mL de tampão de extração

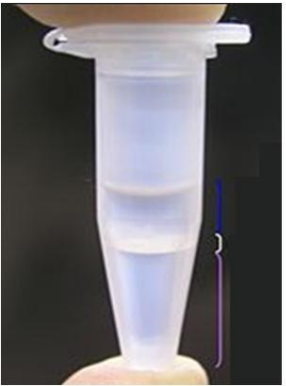


Centrifugar 12000 rpm

Adicionar 0,5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico



Incubar os tubos em banho-maria (70°C) por 20 min.



Fase aquosa: DNA
Interfase: proteínas

Fase orgânica: lipídios

Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar isopropanol

Agregados de moléculas de DNA precipitadas pelo isopropanol

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO

Tris-HCl pH 8,0 => manter o pH da solução durante a extração e evitar a ação de nucleases que podem degradar o DNA (o pH ótimo para ação de DNAses endógenas fica por volta de 7,0);

EDTA (ácido etileno diamono tetracético) => substância quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} e, portanto, inibe a ação de DNAses, que usam esses metais como cofatores;

CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) => detergente para romper as membranas celulares;

PVP (polivinilpirrolidona) => O DNA deve ser protegido da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA irreversivelmente. Agentes anti-oxidantes: PVP, BSA (albumina de soro bovino) ou β-mercaptoetanol;

NaCl => sal, adicionado para auxiliar na precipitar o DNA.

Clorofórmio => desnatura as proteínas e as tornam insolúveis na fase aquosa, onde encontram-se os ácidos nucleicos;

Isopropanol => precipita o DNA na presença de íons como Na^{+};

N_2 líquido (-192 °C) => rompe a parede celular durante o processo de maceração do tecido em almofariz com pistilo.

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

http://g1.globo.com/platb/espiral/2008/08/29/a-primeira-descoberta-do-dna/

1. Manda ver e bata tudo no liquidificador:
1/2 xícara de lentilhas
1/8 de colher de chá de sal
1 copo de água gelada

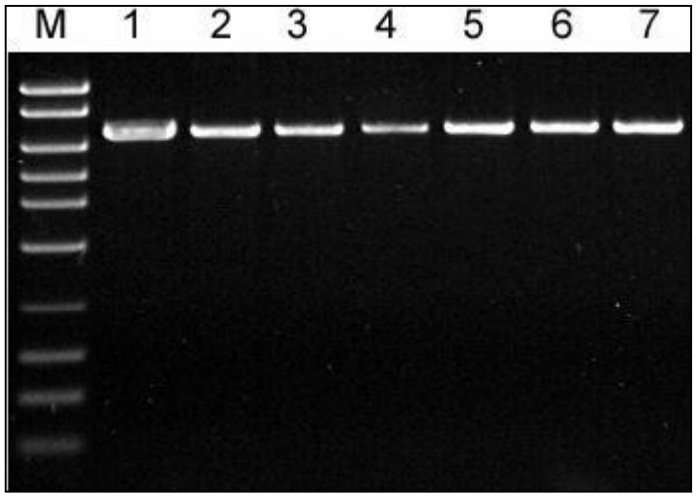
2. Use um coador para eliminar os pedaços maiores. Adicione 2 colheres de detergente (uns 30 mLs) e mexa com uma colher. Deixe quieto por uns 5 minutos. Transfira o "caldo" para um tubo de vidro, encha menos que a metade do tubo (um copo de coquetel fino e pequeno funciona).

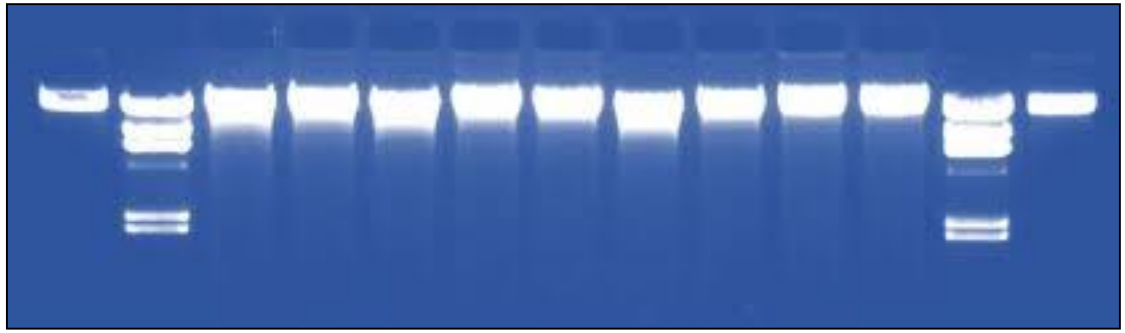
3. Para digerir as proteínas, coloque um pouco de suco de abacaxi (uns 2 mL). Se não tiver, serve a solução limpadora de lentes de contato. Mexa com um canudo. Devagar para não quebrar o DNA!

4. Com o tubo inclinado, adicione o mesmo volume de álcool, vagarosamente, pela parede do tubo. O álcool é menos denso que a água e deve flutuar por cima do "caldo".

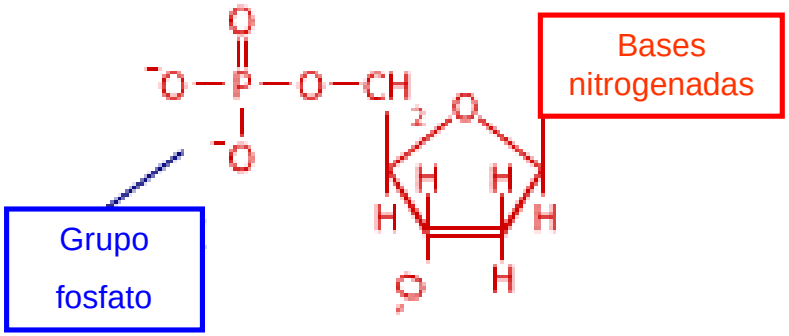
5. O DNA é uma molécula longa. O sal que você adicionou no primeiro passo auxilia as fitas a grudarem, umas nas outras, formando essa "coisa" branca e visocosa que você observa quando coloca o álcool. O DNA se dissolve em água, mas quando em contato com o sal e álcool precipita. Você consegue isolar o DNA enrolando esse precipitado num palito.

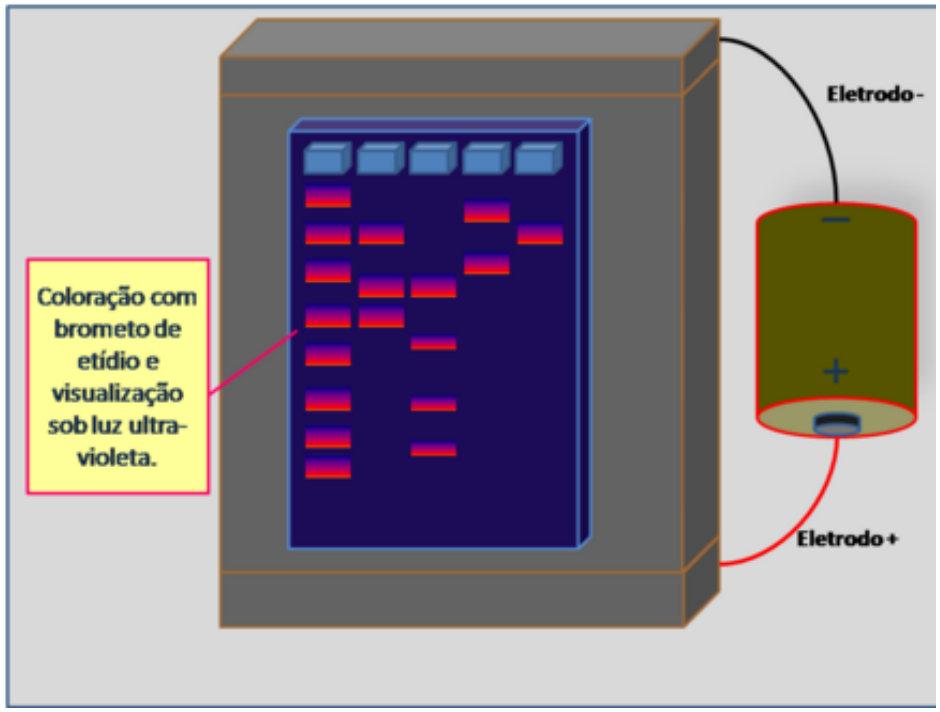
COMO EU VISUALIZO O DNA EXTRAÍDO?





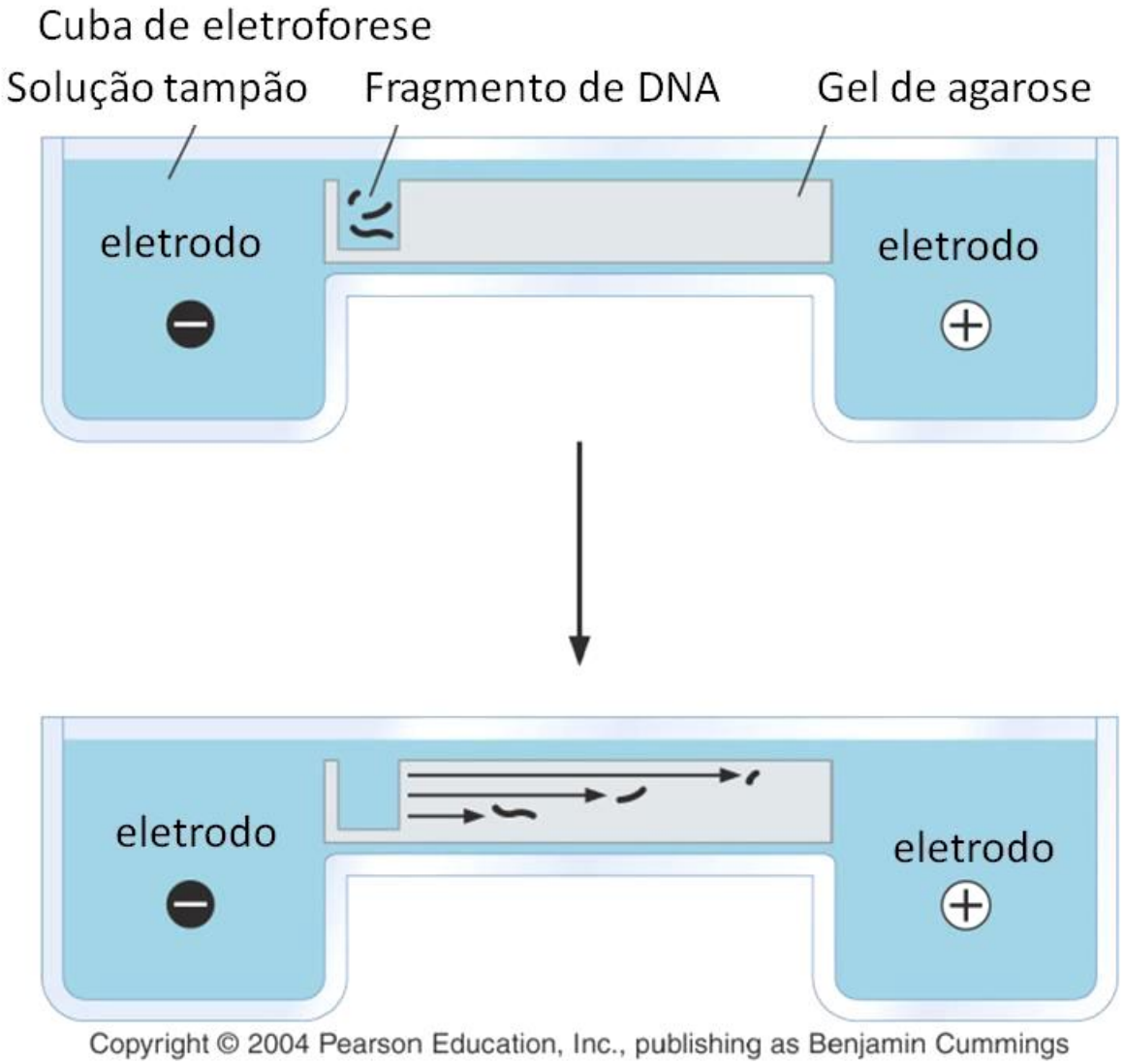
ELETROFORESE



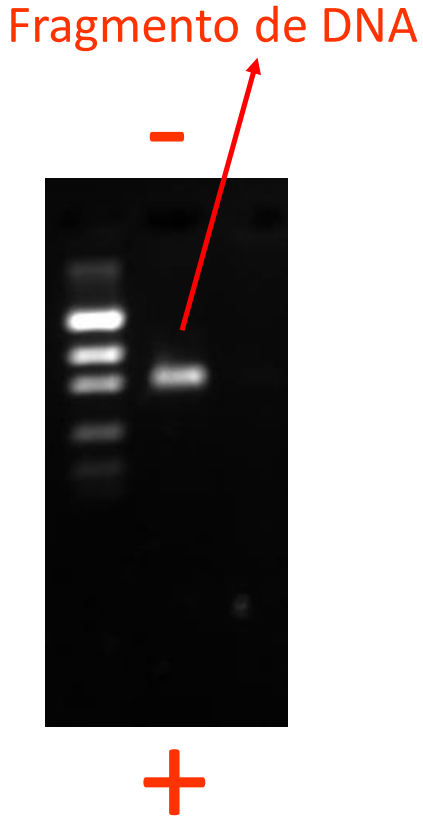


Técnica de separação de moléculas (DNA, RNA, proteínas) por meio da diferença de potencial entre dois eletrodos em uma matriz polimerizada (gel).

SISTEMA DE ELETROFORESE



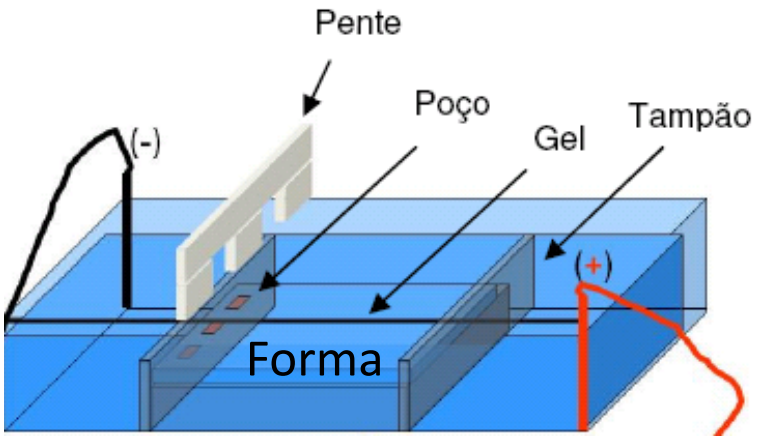
Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings



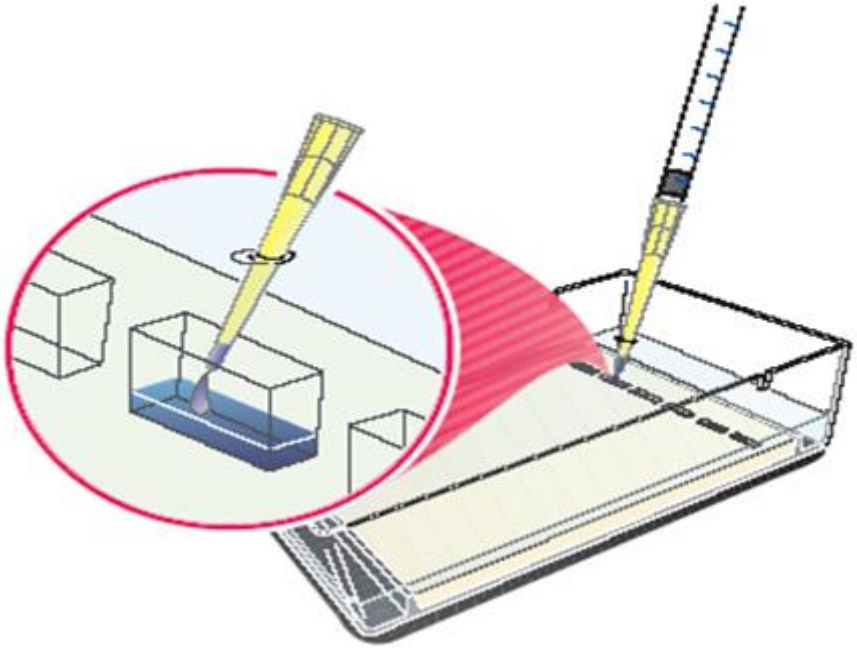
PREPARO DO GEL DE AGAROSE

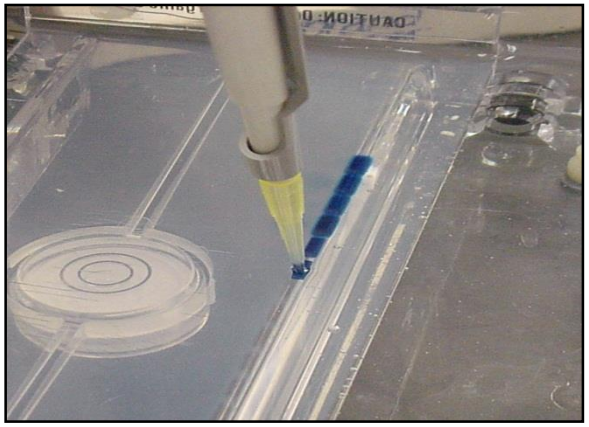
- Fundir a agarose em tampão e aplicar em forma específica;
- Esperar esfriar, retirar o “pente” e desmontar o recipiente.

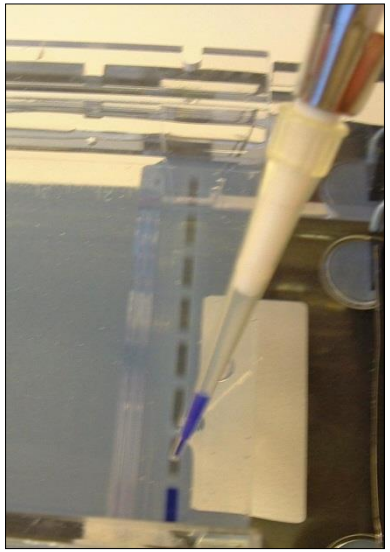
Cuba de eletroforese

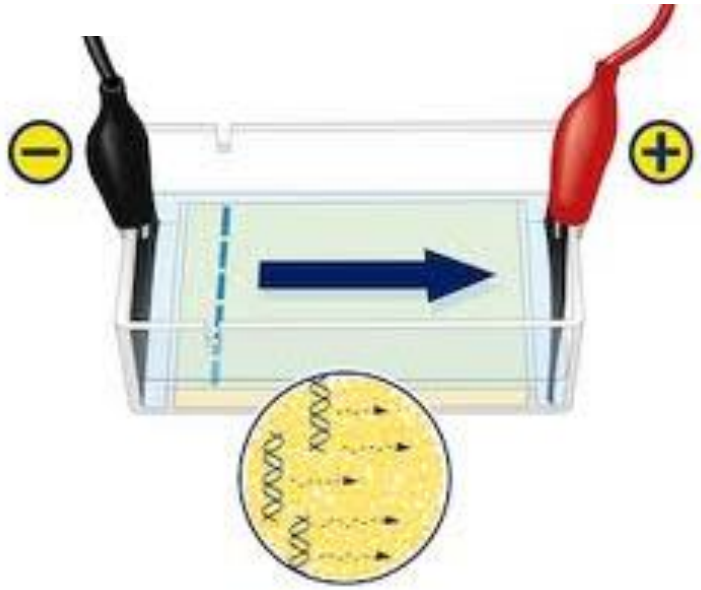


APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS NO GEL



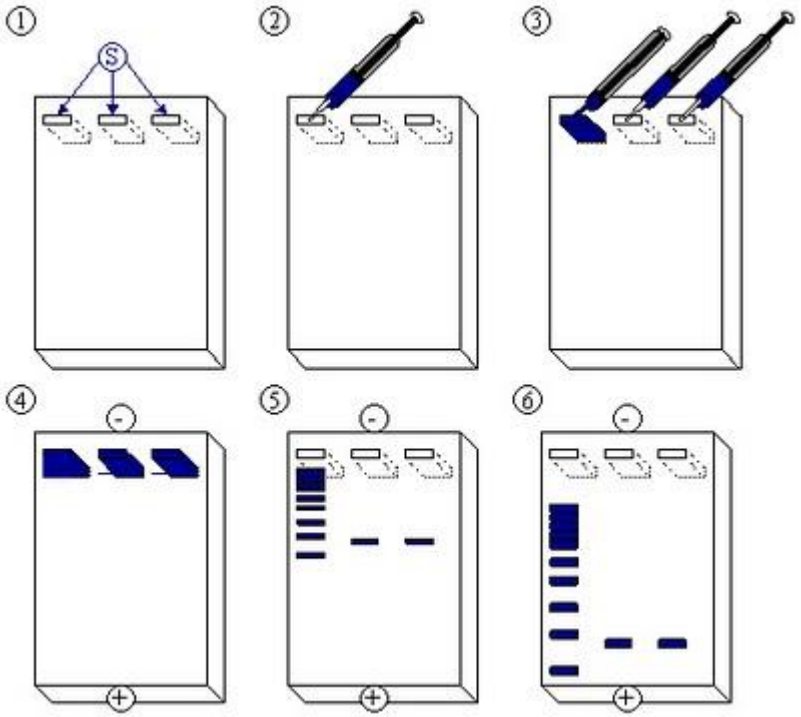


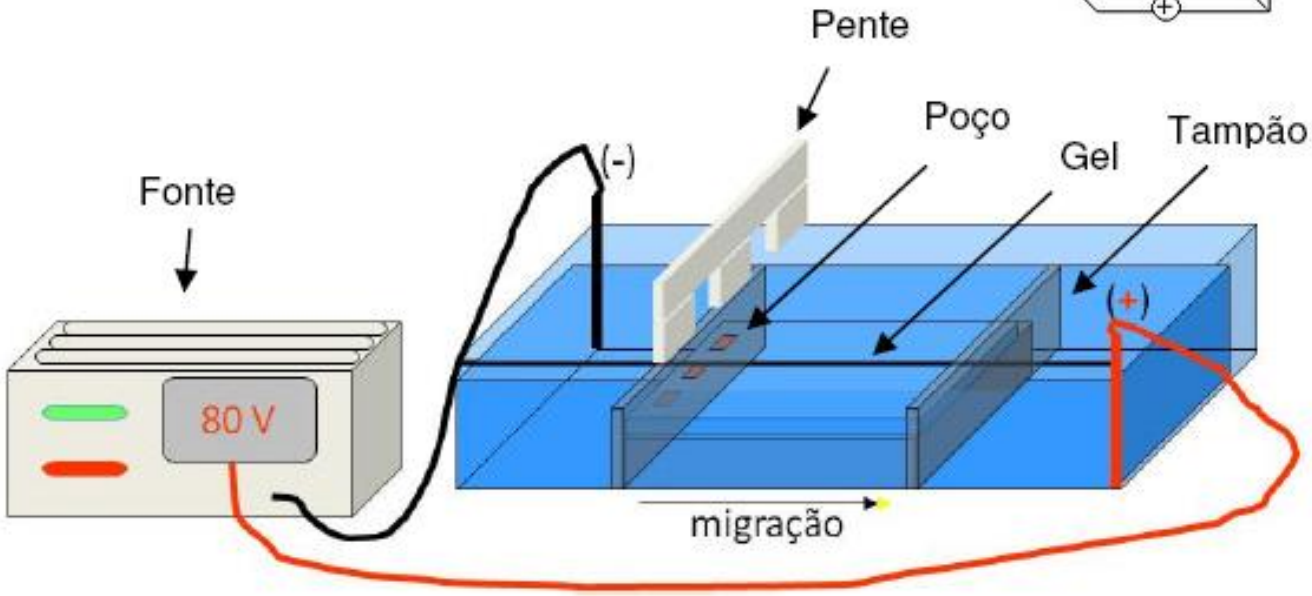




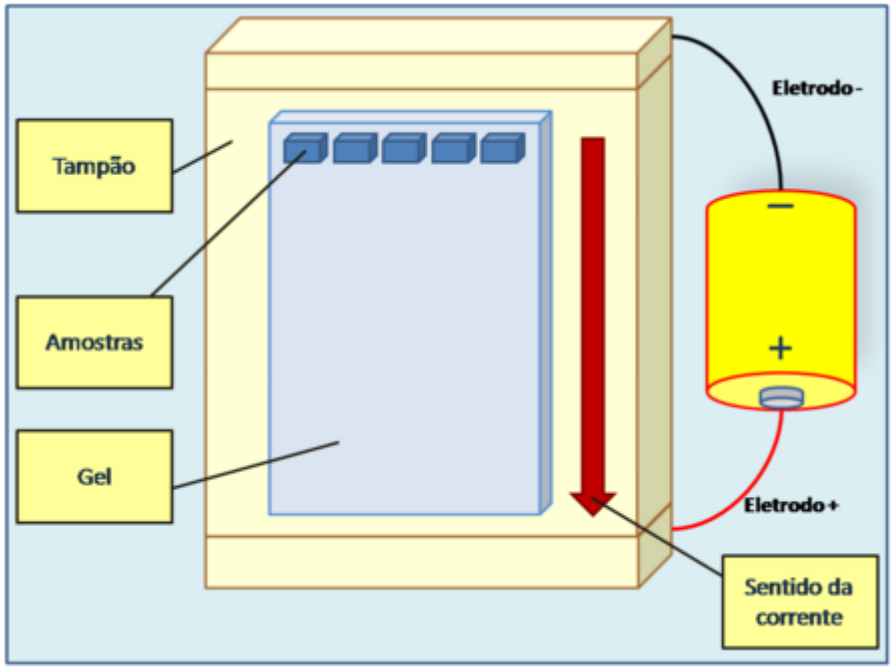
ELETROFORESE

Fonte de eletroforese

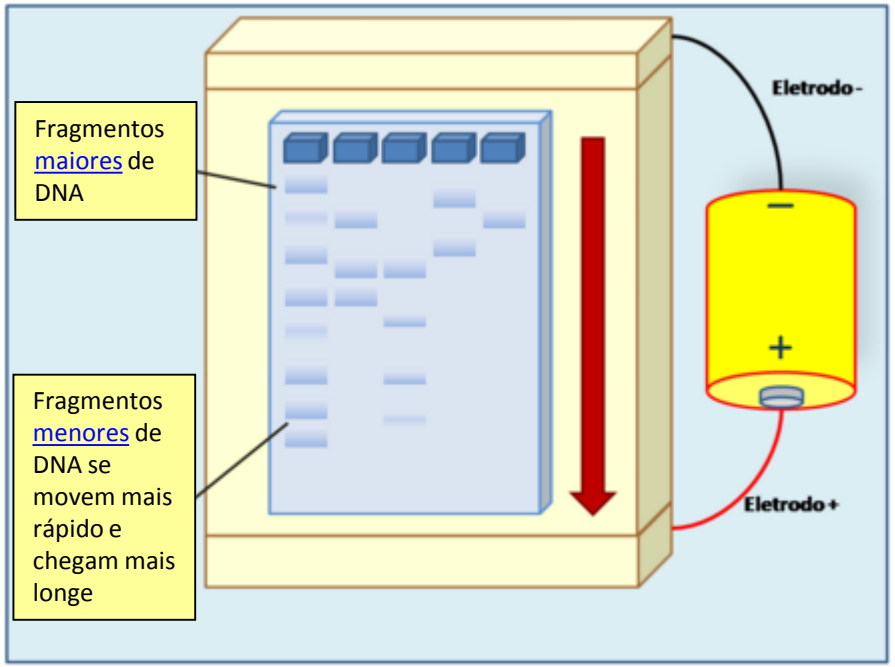




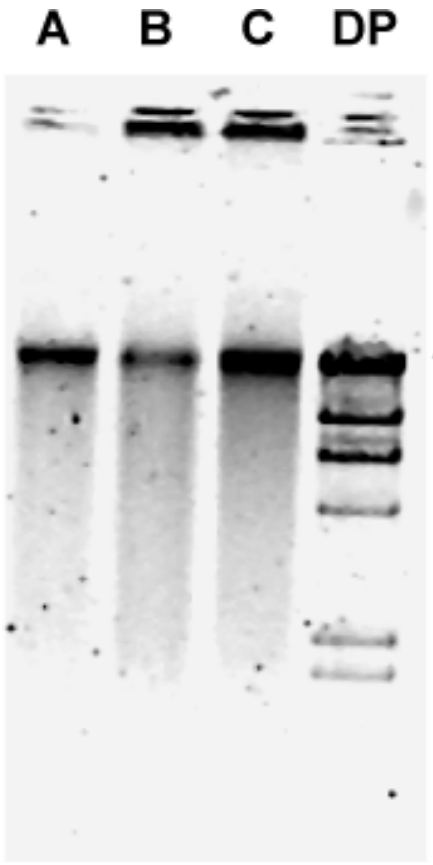
ELETROFORESE



DNA sempre migra do polo negativo para o polo positivo!



ANÁLISE DO RESULTADO

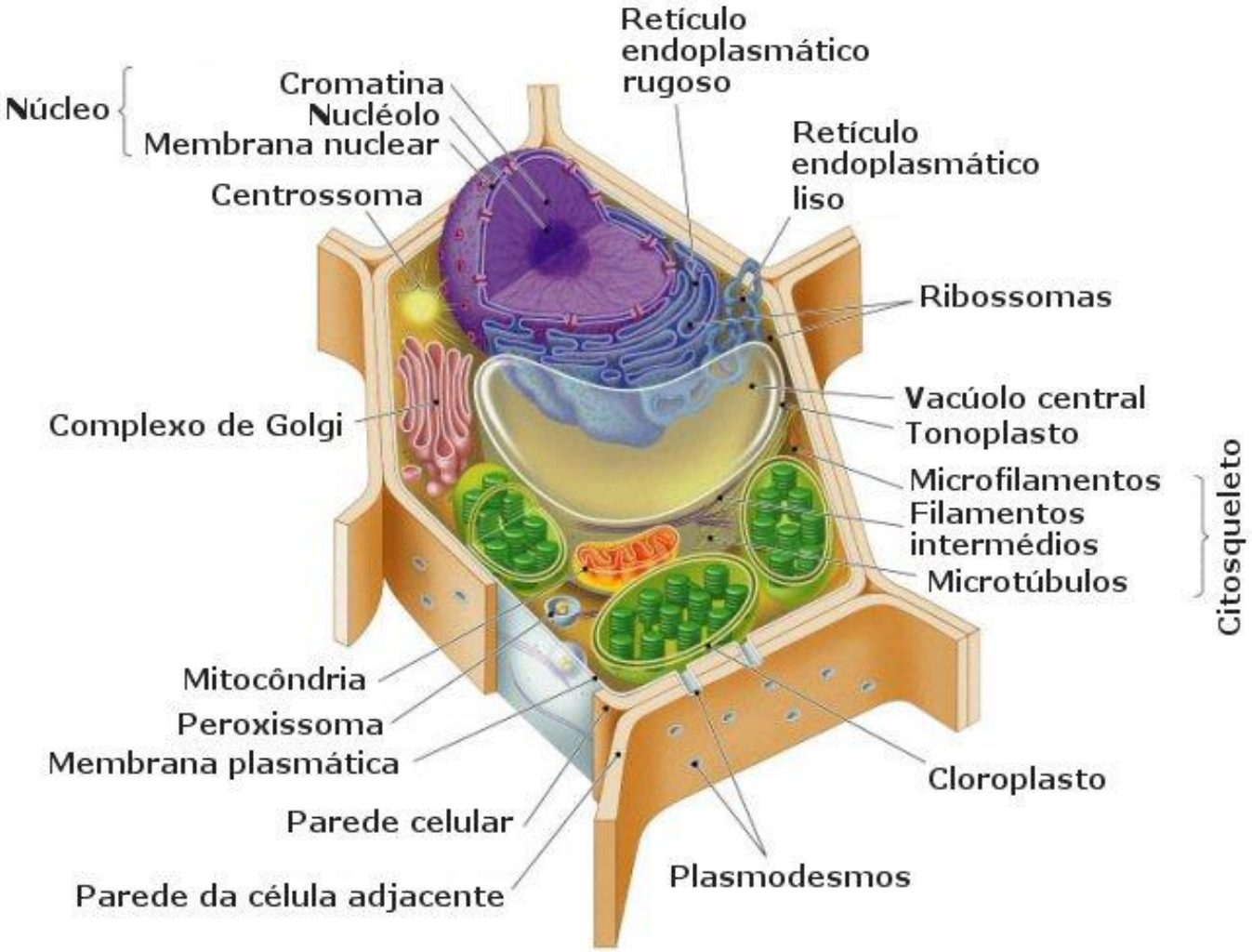


23130 bp ou 23,130 Kbp

FIGURA 2 - Perfil eletroforético de DNA [1000 ng/µl] extraído de folhas de *Passiflora* spp. pelos métodos **A**. Tai & Tansley (1991), **B**. Cheung *et al*. (1993) e **C**. Doyle & Doyle (1991). **DP**=DNA padrão (Hind III) (Londrina, 2000)

✓**ONDE ENCONTRAMOS MOLÉCULAS DE DNA?**

✓**ONDE SE FORMAM OS DIVERSOS TIPOS DE RNA E EM QUE LOCAIS SÃO ATIVOS E PODEM SER ENCONTRADOS?**



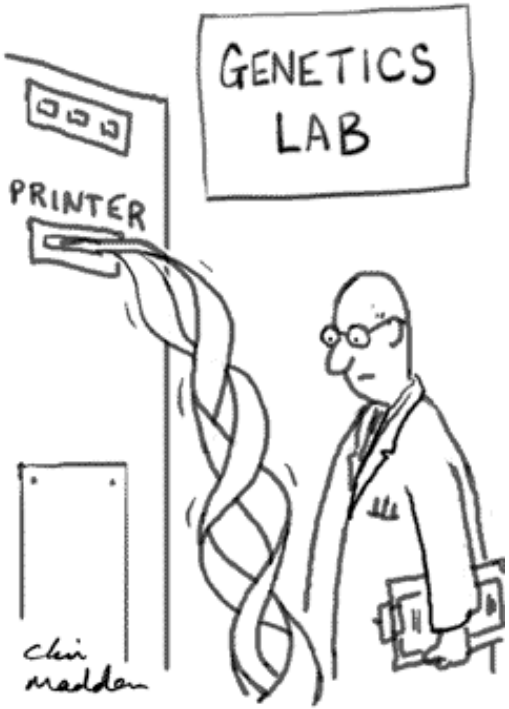
GEL DE ELETROFORESE

http://www.dnalc.org/resources/animations/gelelectrophoresis.html

ESTUDO DIRIGIDO

1. Como extrair ácidos nucleicos (procedimentos e reagentes);
2. Componentes do tampão de extração de DNA;
3. Como visualizar o DNA extraído?
4. Onde encontramos moléculas de DNA na célula?
5. Onde se formam os diversos tipos de RNA e em que locais são ativos e podem ser encontrados?

Bom trabalho!!!



AGRICULTURA

Extração de DNA de plantas

Eduardo Romano, Biólogo Molecular, M.Sc.
Ana Cristina Miranda Brasileiro, Bióloga Molecular, Ph.D.
CENARGEN/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
romano@cenargen.embrapa.br

SOLUÇÕES PARA PROBLEMAS COMUMENTE ENCONTRADOS

O isolamento de DNA de plantas e de material vegetal proveniente de cultura de tecidos é uma etapa importante na análise da estrutura e organização do genoma de plantas. Essas análises necessitam, freqüentemente, usar enzimas de restrição, que cortam o DNA em fragmentos, para ser que é utilizado em *Southern blot* ou em construção de bibliotecas genômicas. Preparações de DNA vegetal também são, comumente, utilizadas como substratos em reações de PCR para estudos

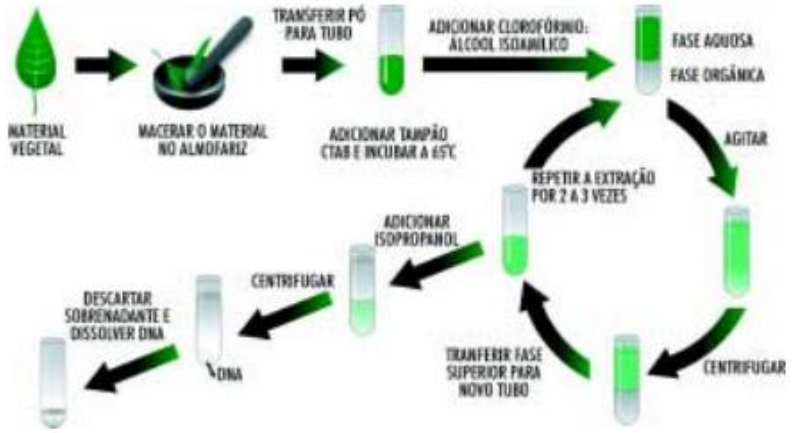


Figura 1: Esquema representativo das etapas de extração de DNA pelo método CTAB.

EXERCÍCIO EXTRA 2

Leia o artigo sugerido em aula e responda as seguintes questões:

a) Cite duas aplicações de estudos com DNA extraídos de plantas;
b) Quais as etapas necessárias para uma boa extração de DNA?
c) Aponte três diferenças entre o método de extração que foi realizado em classe e o método CTAB, sugerido pelos autores.