**QBQ1354 – 2023**

**AULA PRÁTICA 1**

**EXTRAÇÃO DE DNA DE *Escherichia coli***

**FUNDAMENTO**

 Freqüentemente é necessária a purificação de DNA de alto peso molecular para sua manipulação e análise subseqüentes. Procedimentos mais comuns para preparação de DNA genômico bacteriano consistem na lise das bactérias com a utilização de lisozima e/ou detergente, seguida de extrações com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio) para remoção de proteínas. Os ácidos nucléicos são então precipitados com etanol na presença de concentrações relativamente altas de sal (0,1M – 0,5M). Na obtenção de DNA de alto peso molecular (molécula longa e fibrosa) devem ser tomados cuidados para se evitar sua fragmentação.

**PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

 Utilizar uma cultura de bactérias *E.coli* DH5α que foi inoculada no final da tarde do dia anterior em meio de cultura líquido esterilizado (meio LB: triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH final ajustado para 7,5 com NaOH) e mantida sob agitação vigorosa a 37°C por uma noite. Na manhã seguinte, transferir a cultura para a geladeira, onde deve ser mantida até o momento da experiência.

1. Coletar as bactérias pela centrifugação de 15ml da cultura a 5000rpm por 5 min. Descartar o meio de cultura em um frasco contendo lisofórmio a 10%. Secar bem o tubo, invertendo-o sobre papel absorvente. **Balancear os tubos.**
2. Adicionar 6ml da solução I (citrato de sódio 0,015M, NaCl 0,15M, pH final ajustado para 7,0 com HCl). Tampar o tubo e ressuspender o precipitado de bactérias por inversão.
3. Remover a tampa e adicionar 0,7ml da solução II [Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10% (P/V)]. Fechar o tubo e incubá-lo em banho-maria a 60°C por 10min, com agitação manual suave.
4. Retirar o tubo do banho, abrir e deixá-lo a temperatura ambiente por 5 min. Adicionar igual volume (solução I + solução II) da solução III (Clorofórmio:álcool isoamílico 24:1 V/V). **Não pipetar com a boca!**  Fechar muito bem o tubo. Agitar suavemente por 10min a temperatura ambiente. **Esta etapa deve ser realizada na capela de exaustão**.
5. Centrifugar 5 min a 10.000 rpm.
6. Remover delicadamente a fase aquosa (fase superior) com pipeta Pasteur de ponta grossa para uma proveta. Estimar o volume e transferir para um cálice graduado.
7. Medir, na mesma proveta, 2 volumes de etanol resfriado a -20°C e adicioná-lo lentamente com pipeta Pasteur, pela parede do cálice.
8. “Enrolar” o DNA com uma pipeta Pasteur de ponta curva. Transferir DNA para um tubo de ensaio contendo 10 ml de Solução IV (NaCl 1%). Aquecer a 50°C, por 10-20 min, até completa dissolução.
9. Identificar o tubo com o número/nome do grupo. Centrifugar a 5.000 rpm por 5 min. Pipetar 2 ml do sobrenadante em uma cubeta de quartzo e medir a absorbância em 260nm e 280nm. Calcular a relação A260nm/A280nm.
10. Estimar a quantidade de DNA obtida assumindo que A260nm = 1 equivale a 50μg DNA/ml.
11. Incubar DNA a 95°C por 5 minutos e, em seguida, transferir o tubo para o gelo. Medir novamente a A260nm e comparar valor obtido com aquele do passo **9**.