

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

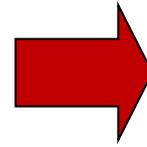
Aula prática 5

LGN0114 – Biologia Celular

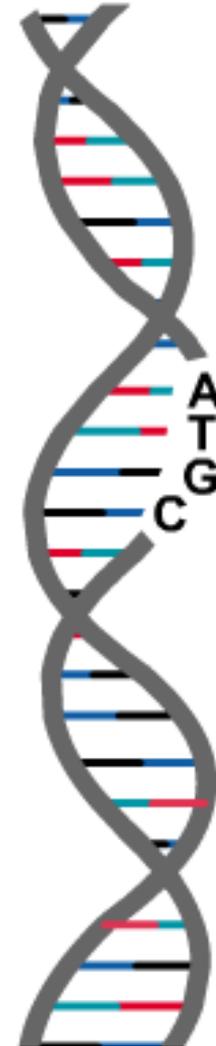


Maria Carolina Quecine
Departamento de Genética
mquecine@usp.br

EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS



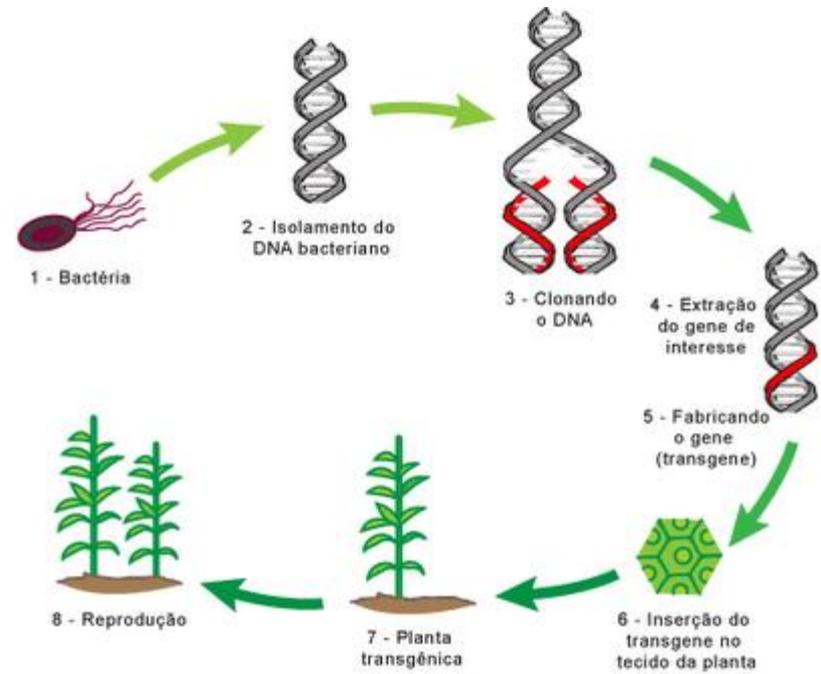
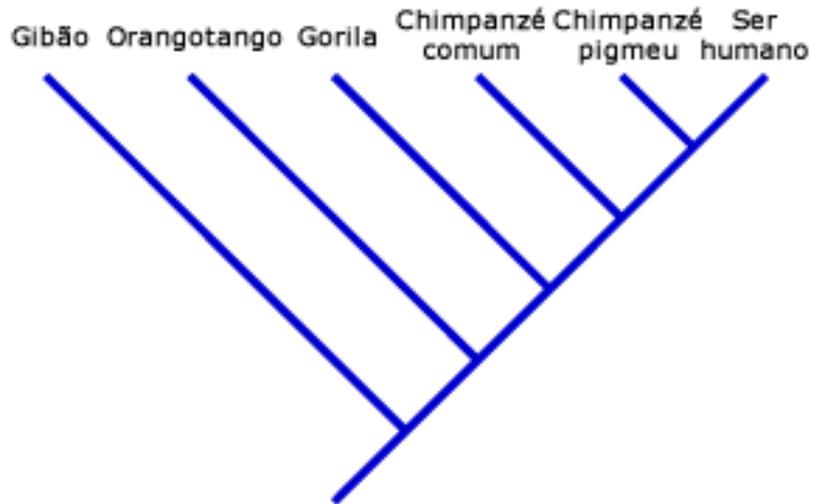
Rompimento da
célula



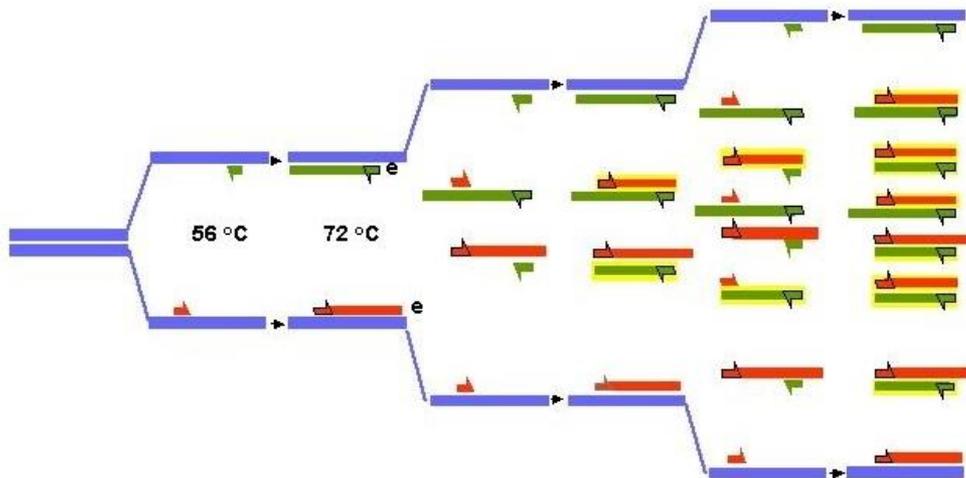
✓ A Biologia Molecular e a Engenharia Genética baseiam-se em técnicas de extração, análise e manipulação de ácidos nucleicos.

✓ 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 N₂ líquido



Adicionar 1,0 mL de tampão de extração



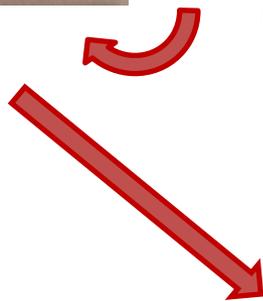
Centrifugar 12000 rpm



Adicionar 0,5 mL de clorofórmio/álcool isoamílico



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



Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar isopropanol



Agregados de moléculas de DNA precipitadas pelo isopropanol

Fase aquosa: DNA
Interfase: proteínas
Fase orgânica: lipídios

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!

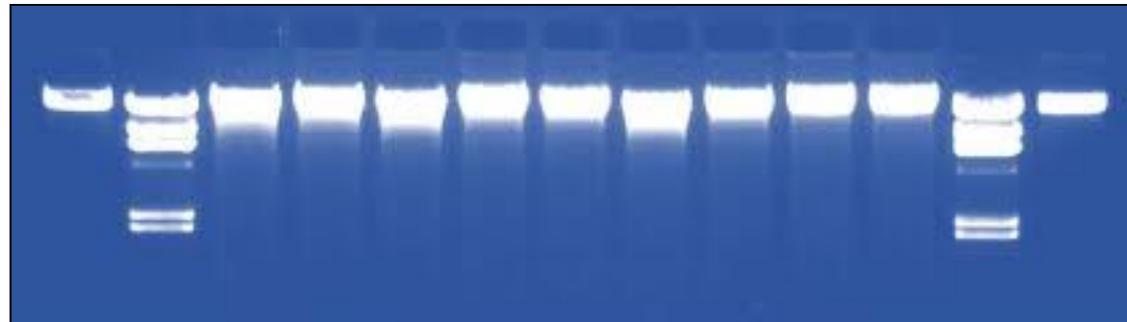
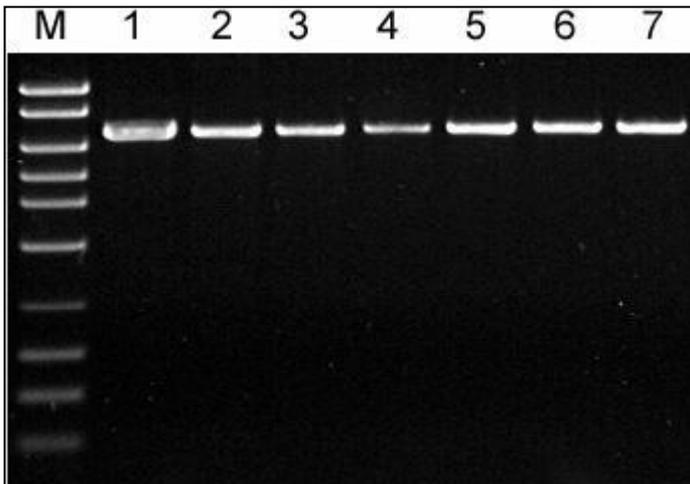


4. Com o tubo inclinado, adicione o mesmo volume de álcool, vagarosamente, pela parede do tubo. O álcool é menos denso que a água e deve flutuar por cima do "caldo".

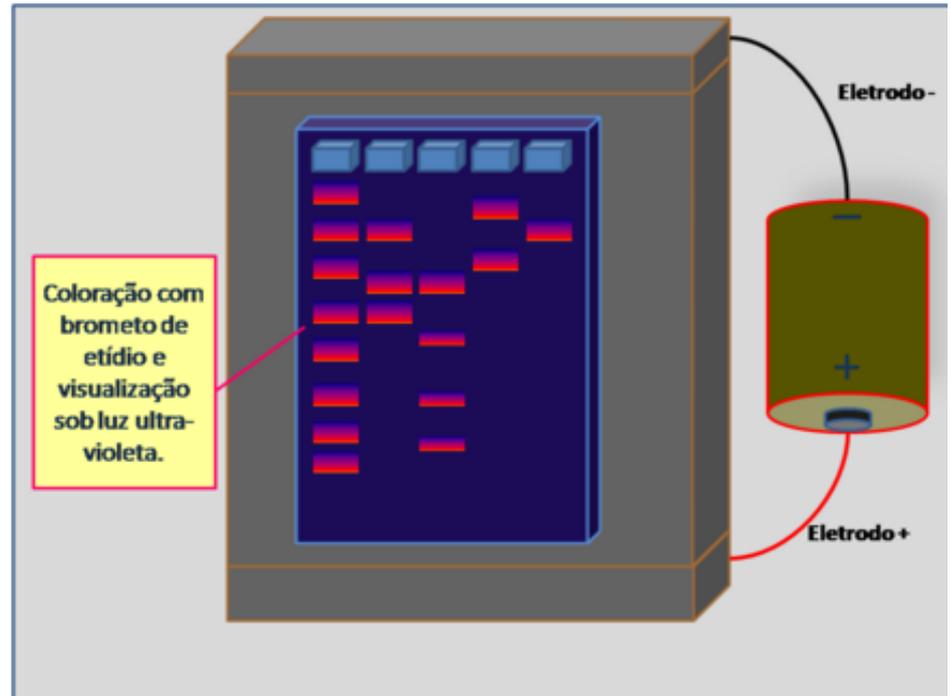
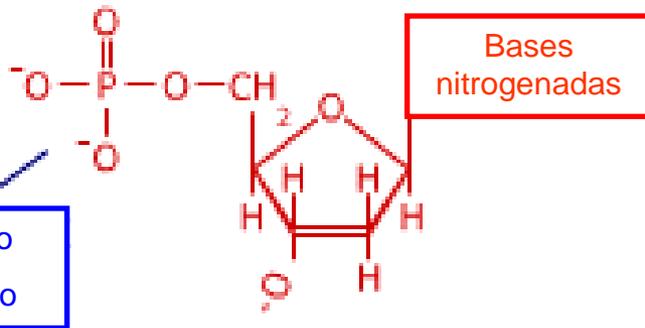
5. O DNA é uma molécula longa. O sal que você adicionou no primeiro passo auxilia as fitas a grudarem, umas nas outras, formando essa "coisa" branca e viscosa que você observa quando coloca o álcool. O DNA se dissolve em água, mas quando em contato com o sal e álcool precipita. Você consegue isolar o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



COMO EU VISUALIZO O DNA EXTRAÍDO?

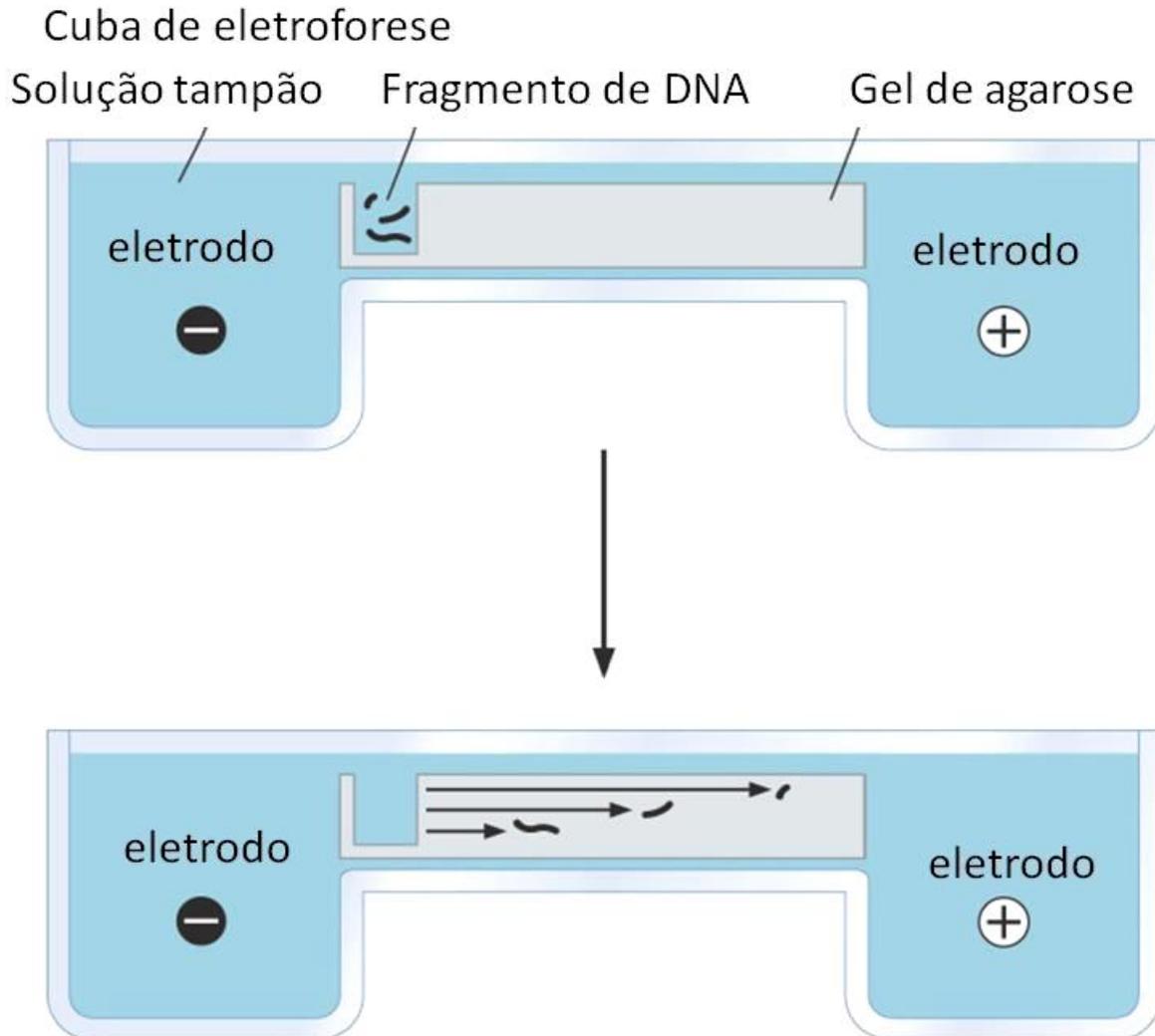


ELETROFORESE

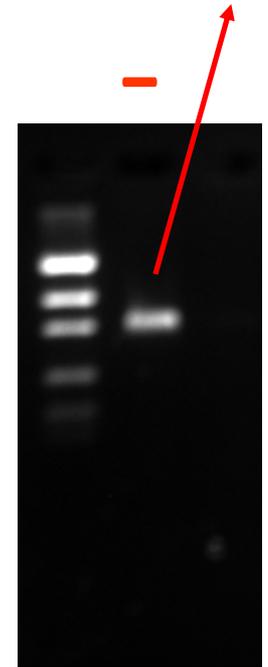


Técnica de separação de moléculas (DNA, RNA, proteínas) por meio da diferença de potencial entre dois eletrodos em uma matriz polimerizada (gel).

SISTEMA DE ELETROFORESE



Fragmento de DNA

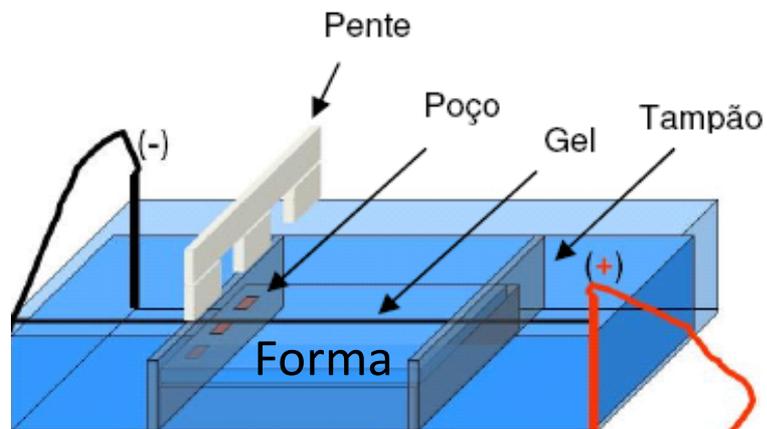


PREPARO DO GEL DE AGAROSE

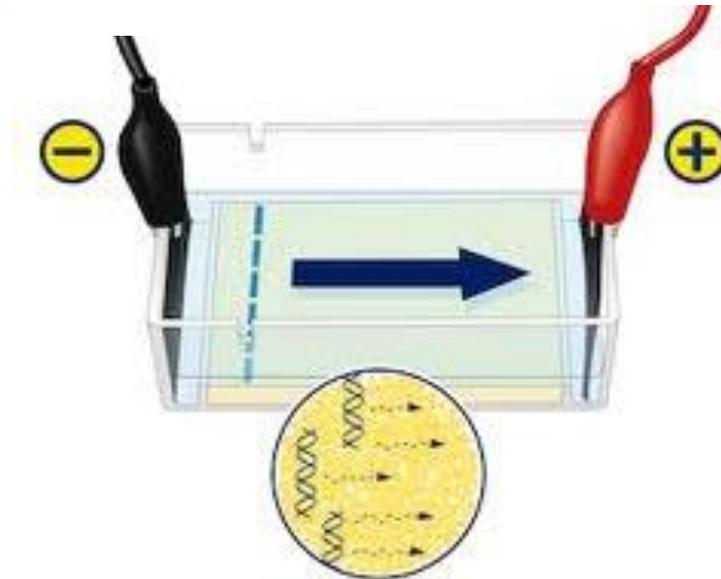
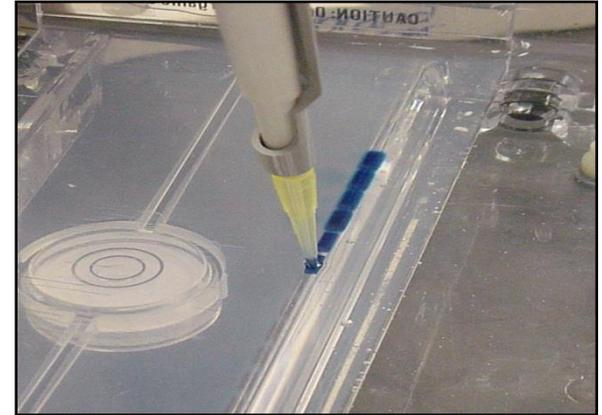
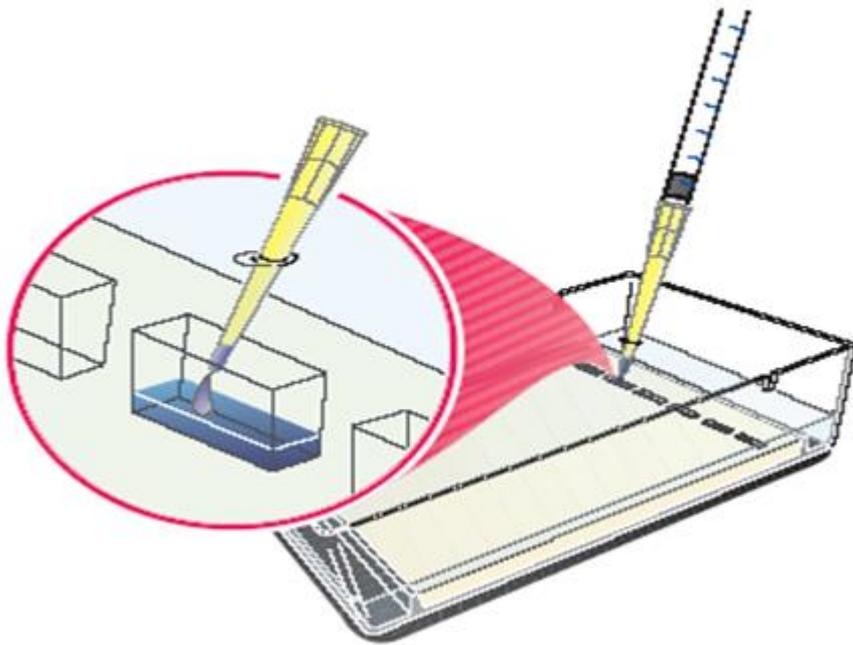
- Fundir a agarose em tampão e aplicar em forma específica;
- Esperar esfriar, retirar o “pente” e desmontar o recipiente.



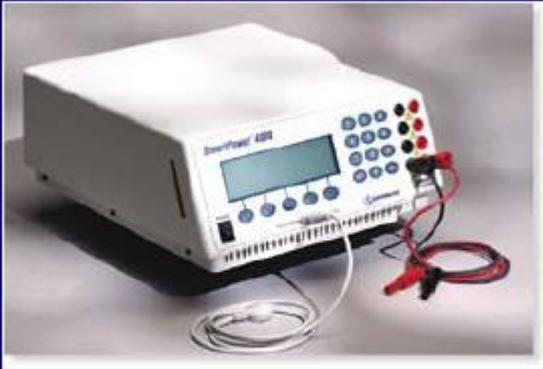
Cuba de
eletroforese



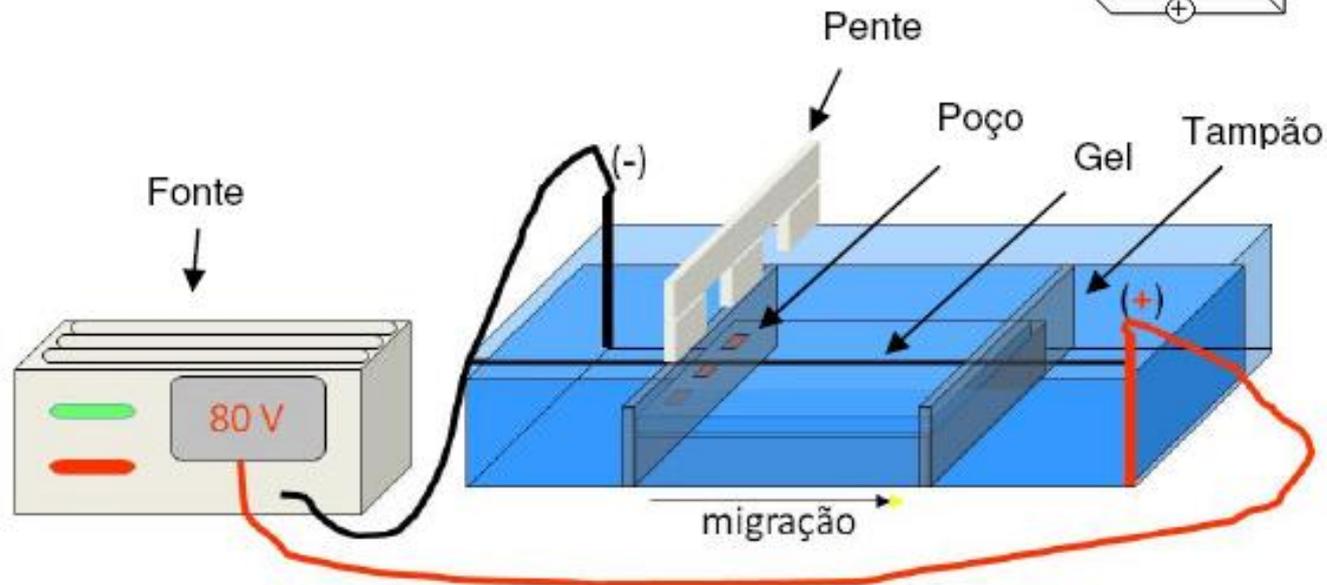
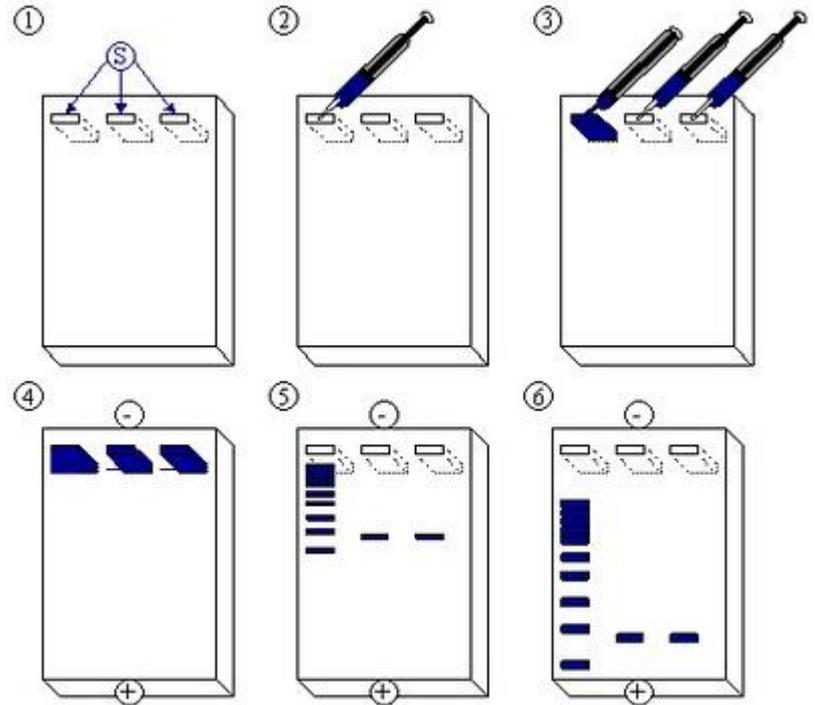
APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS NO GEL



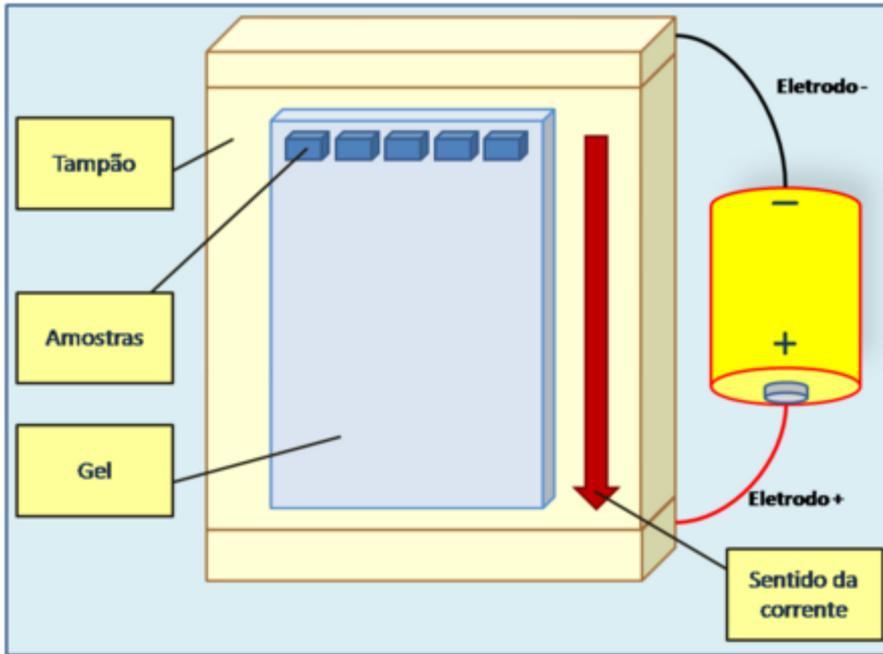
ELETROFORESE



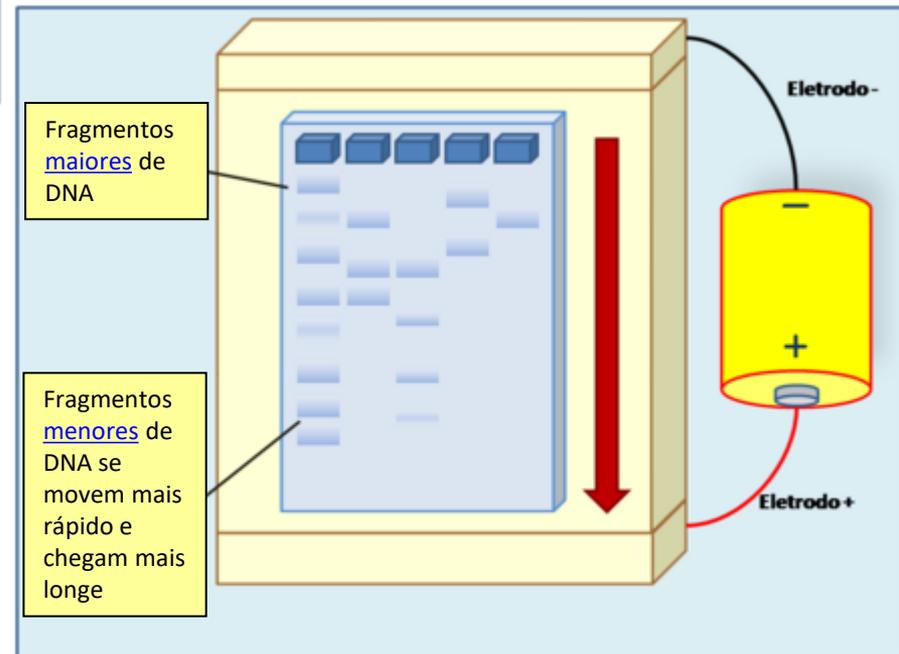
Fonte de eletroforese



ELETROFORESE



DNA sempre migra do polo negativo para o polo positivo!



ANÁLISE DO RESULTADO

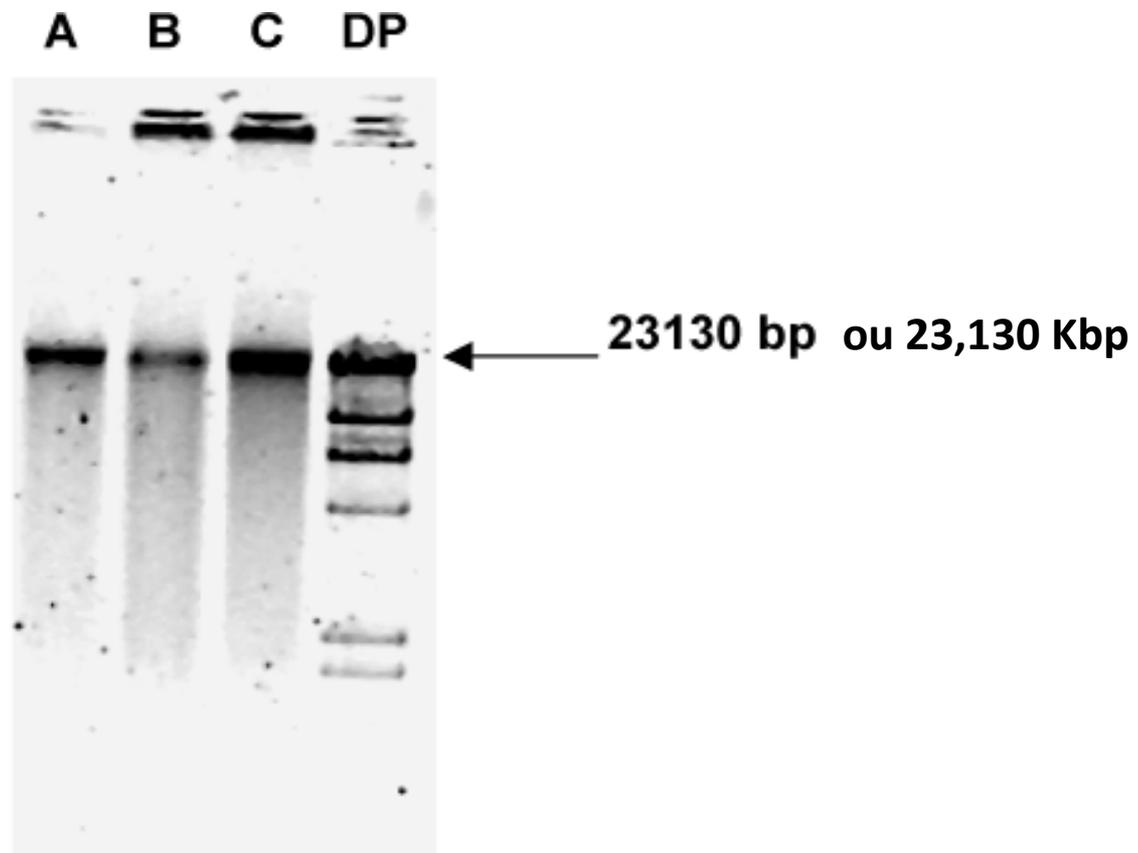
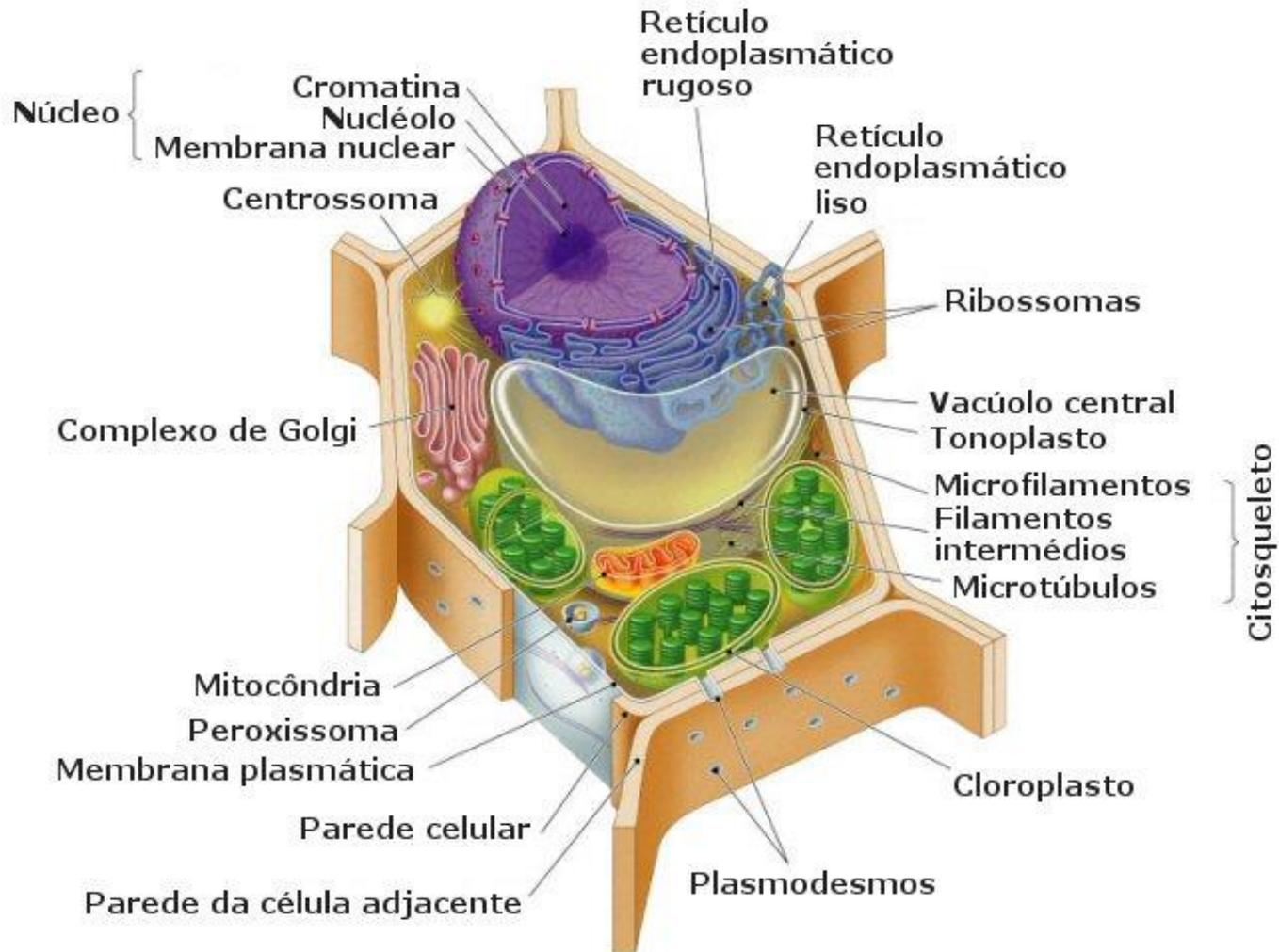


FIGURA 2 - Perfil eletroforético de DNA [1000 ng/ μ l] extraído de folhas de *Passiflora* spp. pelos métodos **A**. Tai & Tansley (1991), **B**. Cheung *et al.* (1993) e **C**. Doyle & Doyle (1991). **DP**=DNA padrão (Hind III) (Londrina, 2000)

✓ 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

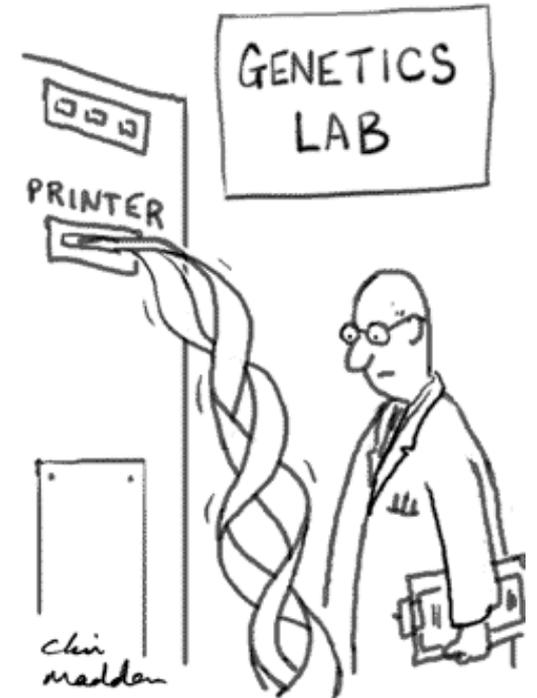
<http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>

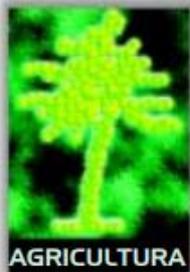


ESTUDO DIRIGIDO

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!!!





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, frequentemente, 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

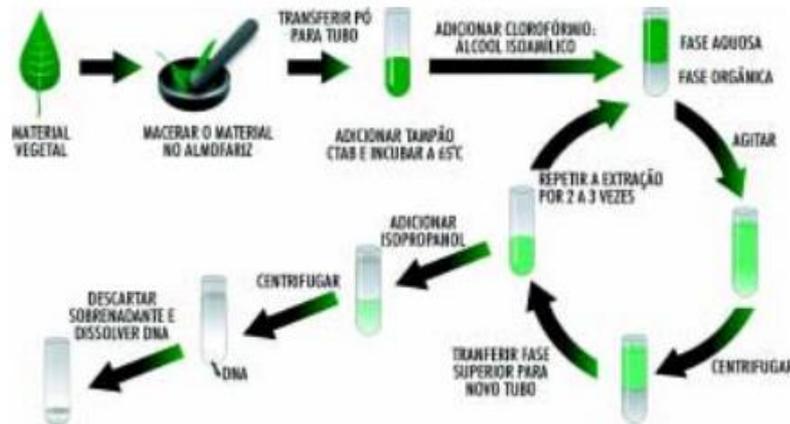


Figura 1: Esquema representativo das etapas de extração de DNA pelo método CTAB.

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.