

## **Gabarito – Aula prática – Extração de DNA genômico**

### **1. Qual a função do SDS, Clorofórmio:Isoamílico e Etanol nas etapas da purificação?**

SDS: lisar célula – solubilizar membrana

Clorofórmio:Isoamílico: Separação dos componentes celulares – DNA permanece na fase aquosa, lipídios vão para fase apolar, proteínas ficam na interfase.

Etanol: precipitação do DNA

### **2. Por que é possível “enrolar” o DNA no bastão de vidro?**

O cromossomo de uma E. coli tem cerca de 1,36mm. Ao precipitar o DNA de uma célula interage com o DNA de outras células formando longas cadeias, dessa forma sendo possível enrolar no bastão.

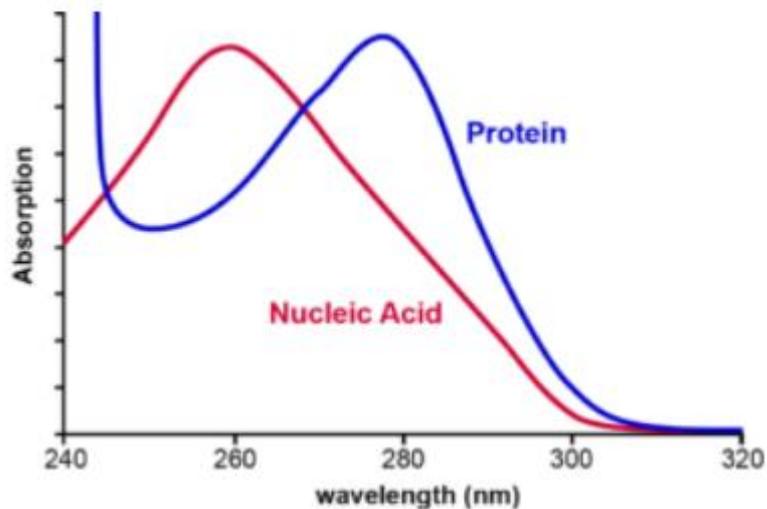
### **3. Se compararmos as razões de absorbância 260nm/280nm da amostra de DNA obtida e com uma solução de DNA puro obtido a partir do mesmo volume inicial de cultura de bactérias notaremos um valor maior para amostra purificada? Porque?**

O DNA puro vai ter uma razão por volta de 1.8

Um dos contaminantes mais comuns na extração de DNA são proteínas. Nesse caso proteínas absorvem mais a 280nm do que a 260nm. Logo a razão 260nm/280nm vai ser menor que 1.8 numa amostra não tão pura.

### **4. Como se compara o espectro de absorção do DNA na luz ultravioleta com o espectro de absorção de proteínas?**

O DNA vai ter seu pico de absorção por volta de 260nm, enquanto proteínas tem seu pico em torno de 280nm.



<https://www.kemtrak.com/application/protein-measurement/>

**5. Como você faria para obter DNA puro a partir dessa preparação que contém DNA e RNA?**

Existem diversas maneiras de se livrar do RNA de uma amostra: A mais convencional é tratar a amostra com **RNaseA**, a qual vai degradar o RNA em nucleotídeos.

Existem métodos alternativos, tais como:

**Extração líquido-líquido com phenol ácido** – Em uma extração normal de DNA se realiza com Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico em um pH por volta 8.0. Nesse caso a amostra de DNA vem contaminada com RNA. Em seguida pode-se fazer uma nova extração, mas agora usando Fenol:Clorofórmio com isotiocianato de guanidina em um pH ácido (4.5). Nessa situação o DNA vai ficar na fase apolar e na interfase enquanto o RNA vai ficar na fase aquosa.

**Hidrólise alcalina do RNA** – o RNA é hidrolisado mais facilmente em condições básicas que o DNA. Mas dependendo da condição pode haver danos no DNA, deve ser feito cuidadosamente.

<https://www.semanticscholar.org/paper/The-Macerprep%3A-a-minimalist-kit-and-enzyme-free-and-Hu/e245648867a934b817fb8aafd470c28a92497a5b>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4893296/>

**Resinas magnéticas** – existem algumas resinas que conseguem capturar diferencialmente RNA e DNA. EX: <https://www.omegabiotek.com/product/ngs->

**Resinas de sílica** – baseada na capacidade de interação diferente do DNA e do RNA na resina de sílica:

### Ion Exchange

- Based on interaction between negatively charged phosphates in DNA and positively charged particles
- DNA binds under low salt conditions
- Protein and RNA can be washed away with higher salt
- DNA is eluted in high salt and recovered by ethanol precipitation
- Nucleic acid can be bound to some resins based on pH



### 6. Como se modifica o espectro de absorção do DNA desnaturado?

O DNA apresenta o efeito hipercrômico quando desnaturado. Ou seja, ele passa a absorver mais quando desnaturado.

Esse efeito independe do tipo de desnaturação do DNA (quer seja por temperatura, pH, ou qualquer outro agente desnaturante).

Quando o DNA está em dupla fita há a ligação de hidrogênio entre as bases, limitando a ressonância dos anéis aromáticos. Quando o DNA está desnaturado essa limitação deixa de ocorrer, e o DNA passa a absorver 37% mais luz UV.