

# EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

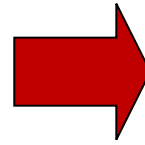
## Aula prática 5

LGN0114 - Biologia Celular

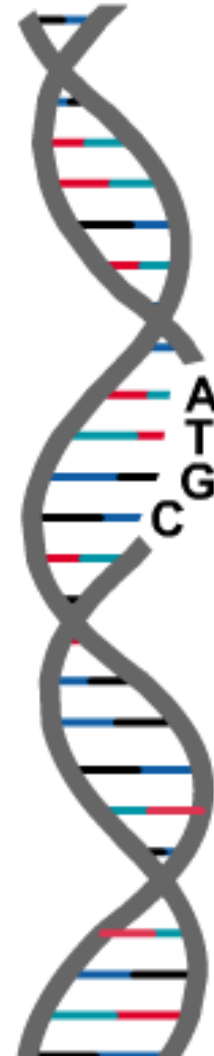


Leandro F. de Souza  
Departamento de Genética  
leandro\_fonseca@usp.br

# EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS



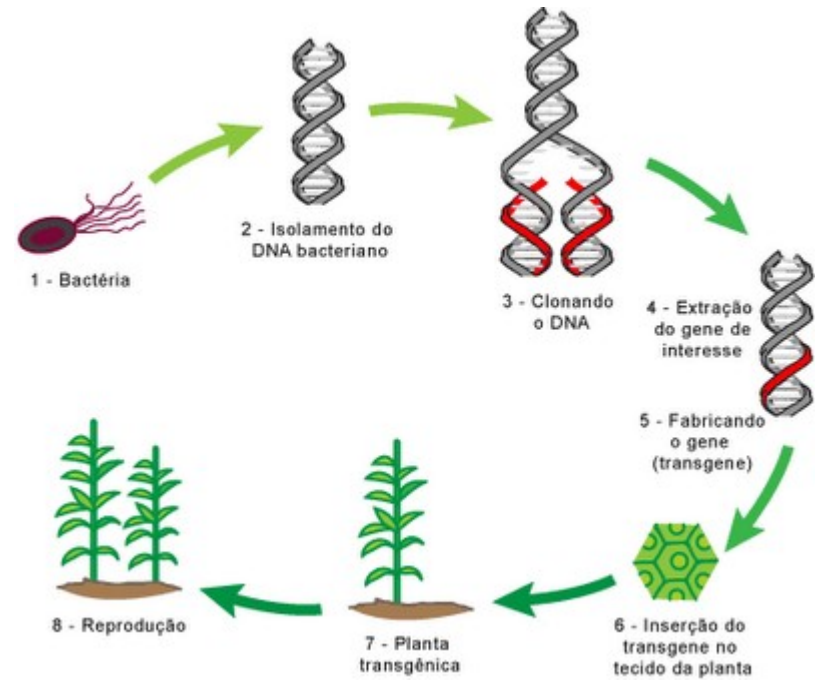
Rompimento da  
célula



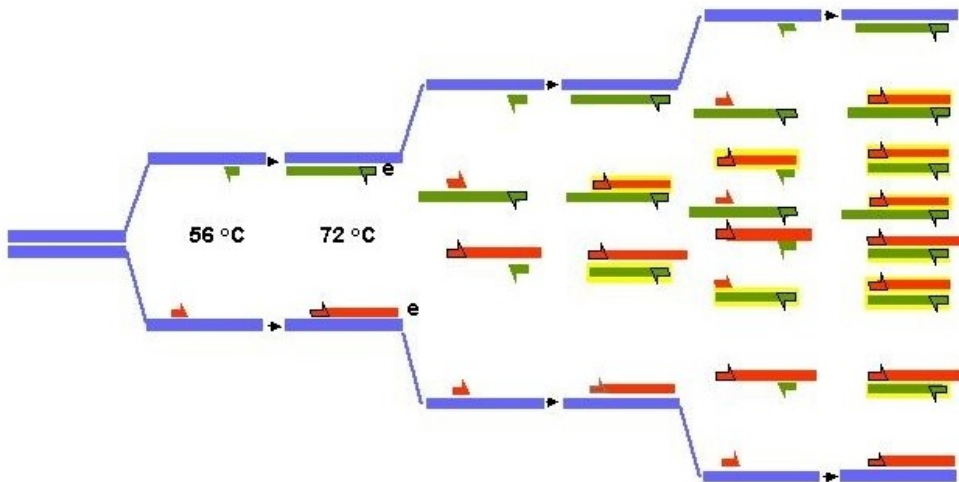
✓ A Biologia Molecular e a Engenharia Genética baseiam-se em técnicas de extração, análise e manipulação de ácidos nucleicos.

✓ 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 N<sub>2</sub> líquido**



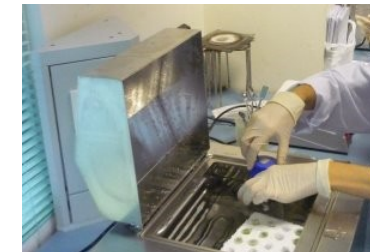
**Adicionar 1,0 mL de tampão de extração**



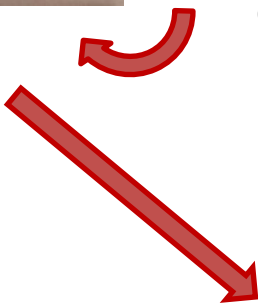
**Centrifugar 12000 rpm**



**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  $\beta$ -mercaptoetanol;

**NaCl** => sal, adicionado para auxiliar na precipitar o DNA e separação das proteínas.

**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  $Na^{+}$ ;

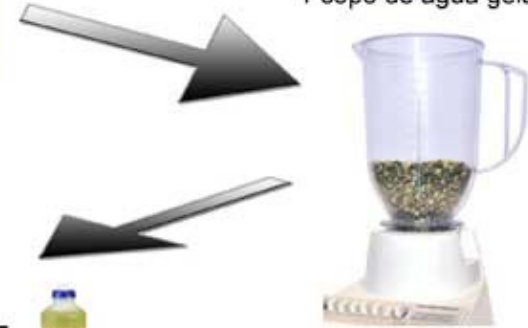
**$N_2$  líquido (-192 °C)** => rompe a parede celular durante o processo de maceração do tecido em almofariz com pistilo.

## 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".

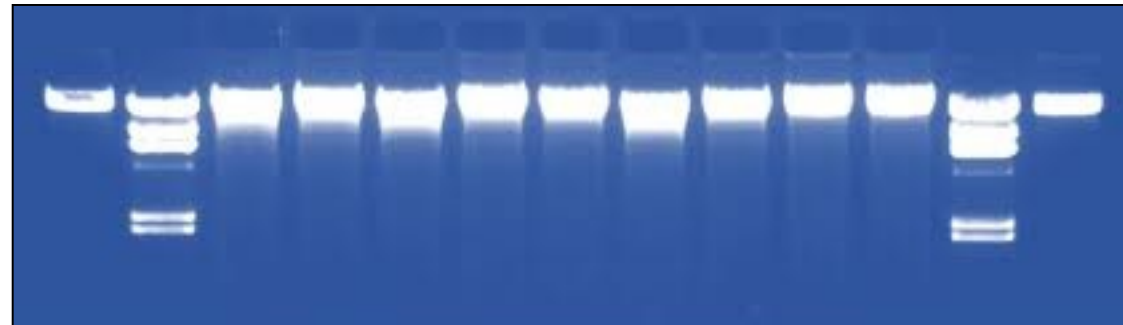
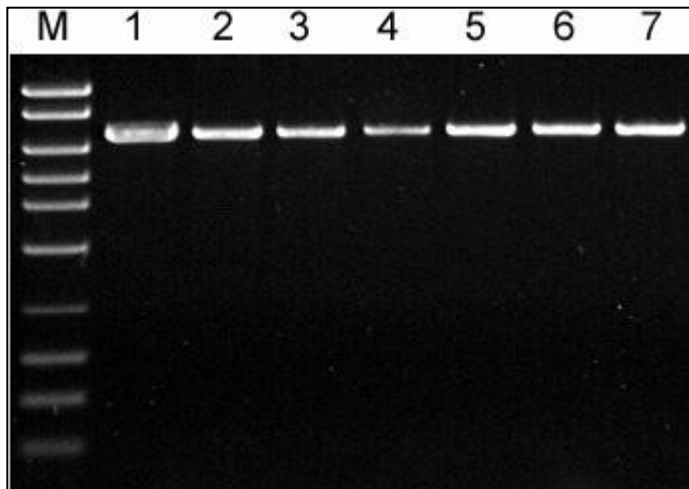


5. O DNA é uma molécula longa. O sal que você adicionou no primeiro passo auxilia as fitas a grudarem, umas nas outras, formando essa "coisa" branca e viscosa que você observa quando coloca o álcool. O DNA se dissolve em água, mas quando em contato com o sal e álcool precipita. Você consegue isolar o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

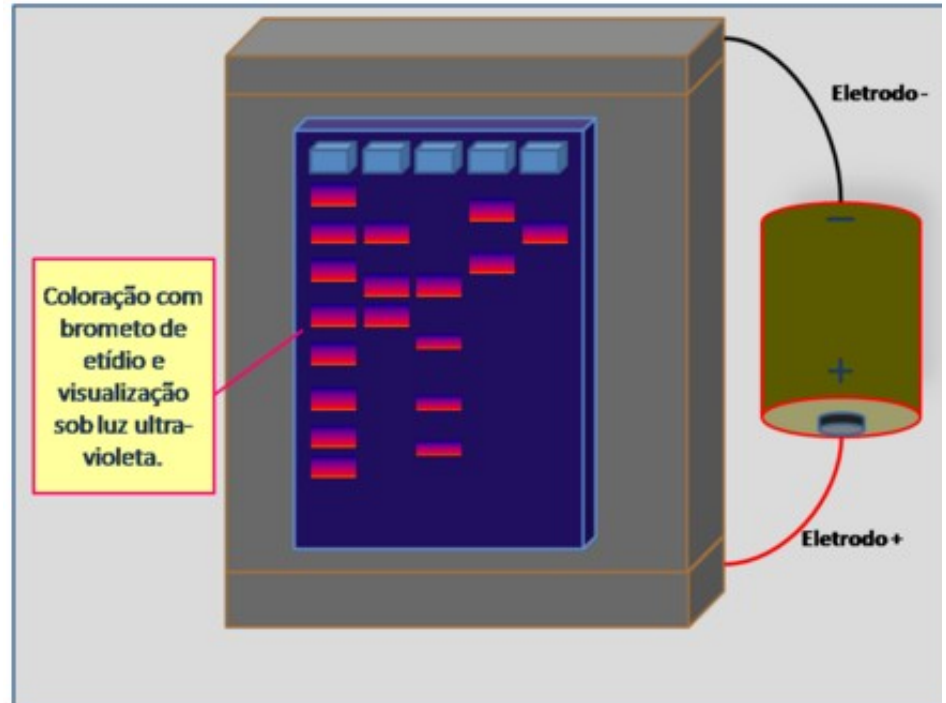
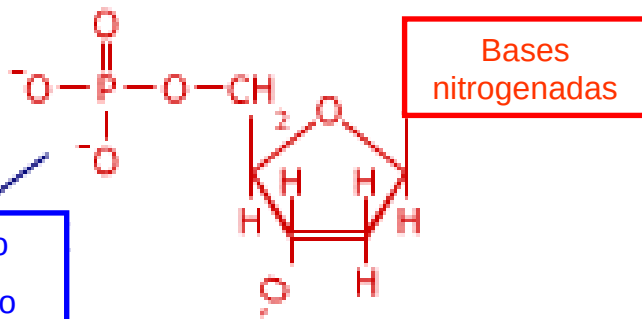




# COMO EU VISUALIZO O DNA EXTRAÍDO?

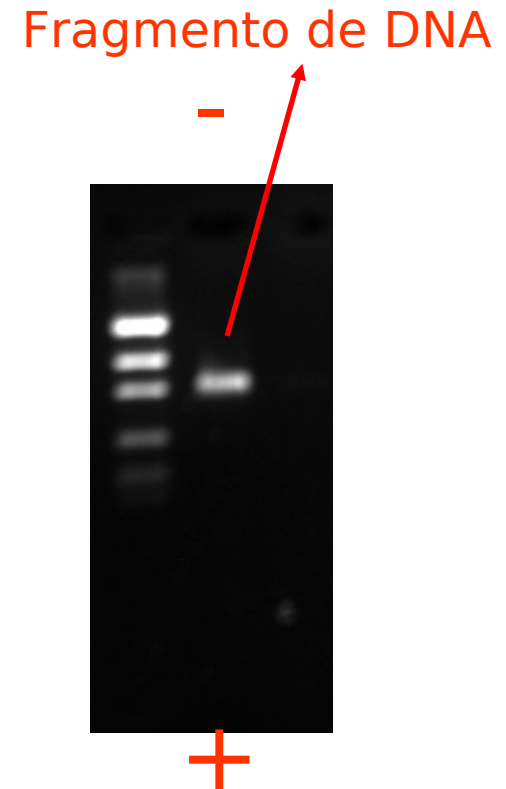
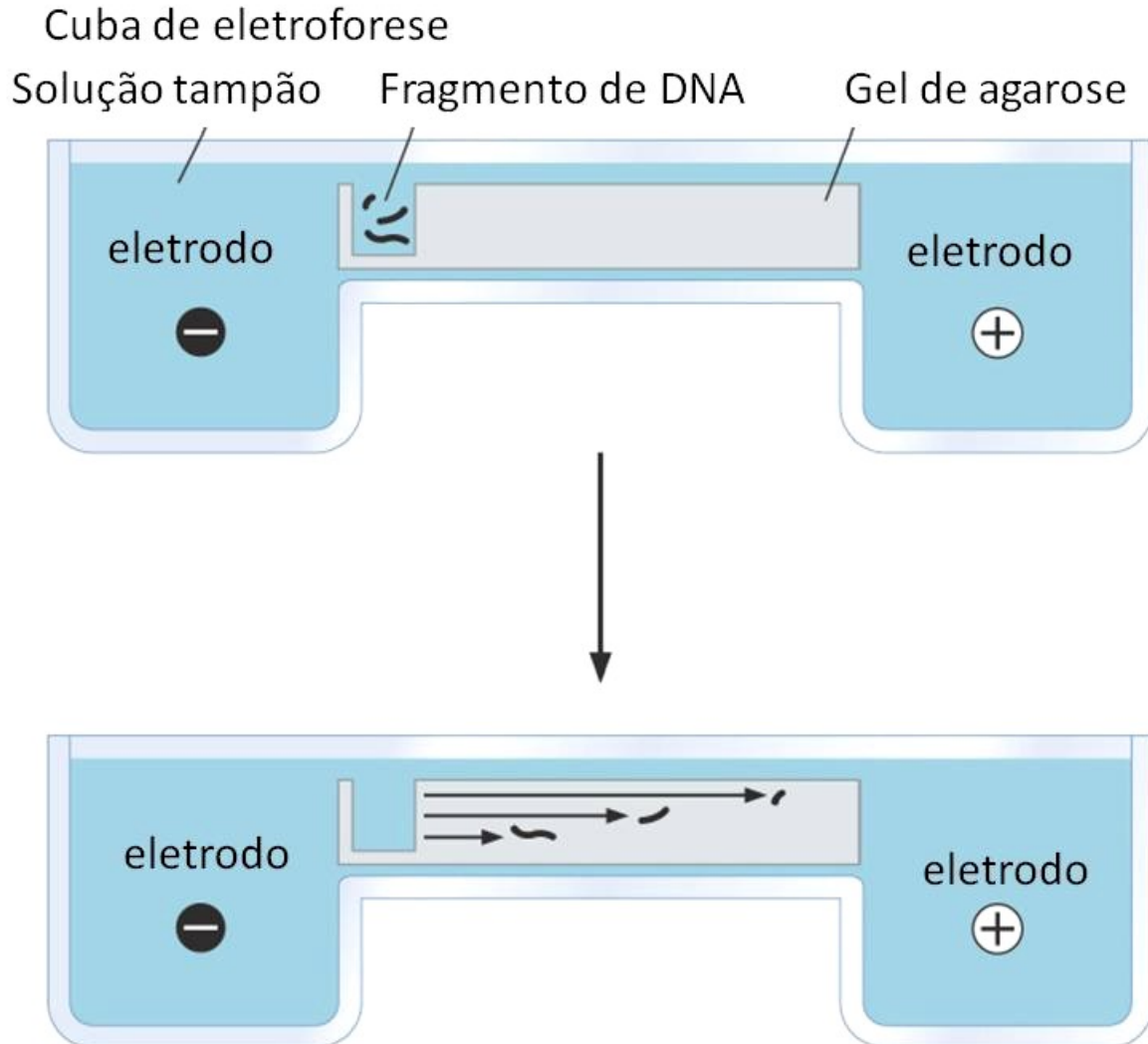


# ELETROFORESE



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

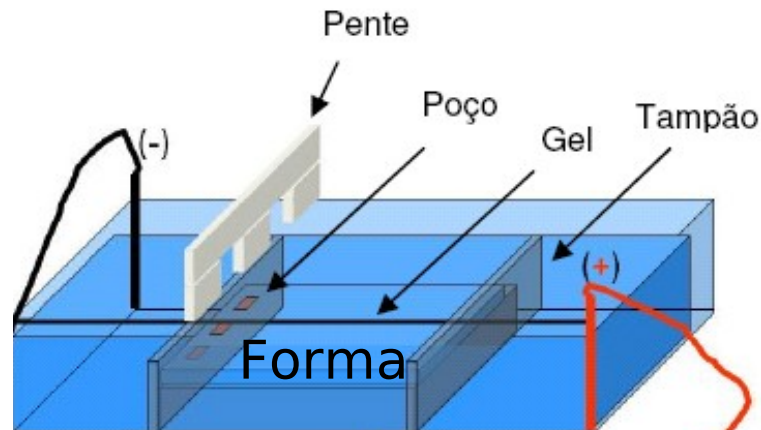


# PREPARO DO GEL DE AGAROSE

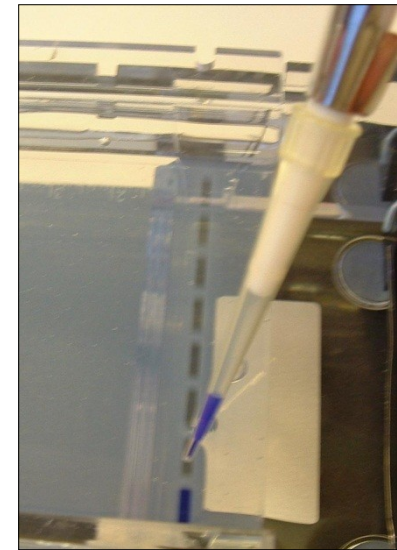
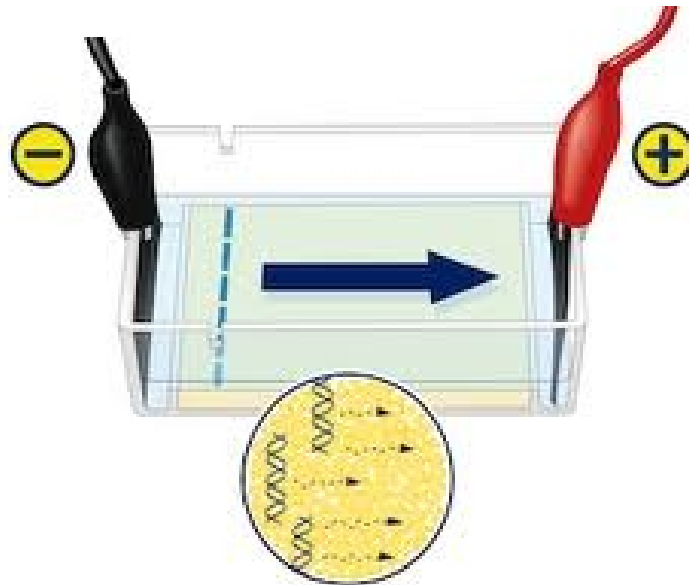
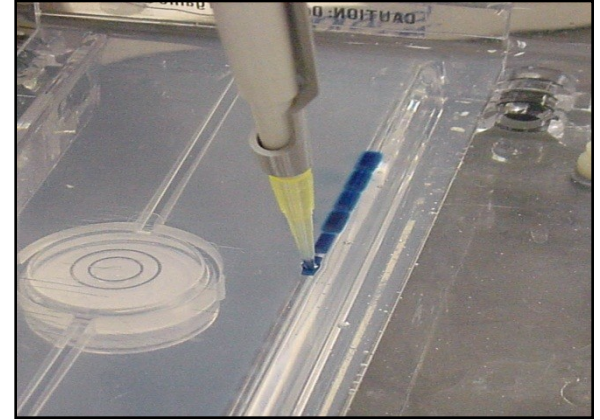
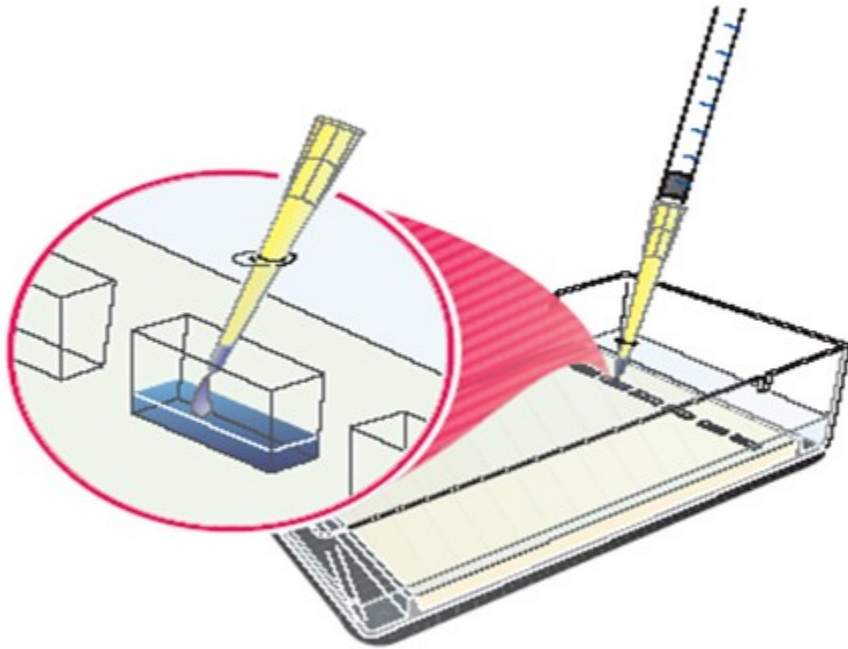
- Fundir a agarose em tampão e aplicar em forma específica;
- Esperar esfriar, retirar o “pente” e desmontar o recipiente.



Cuba de  
eletroforese



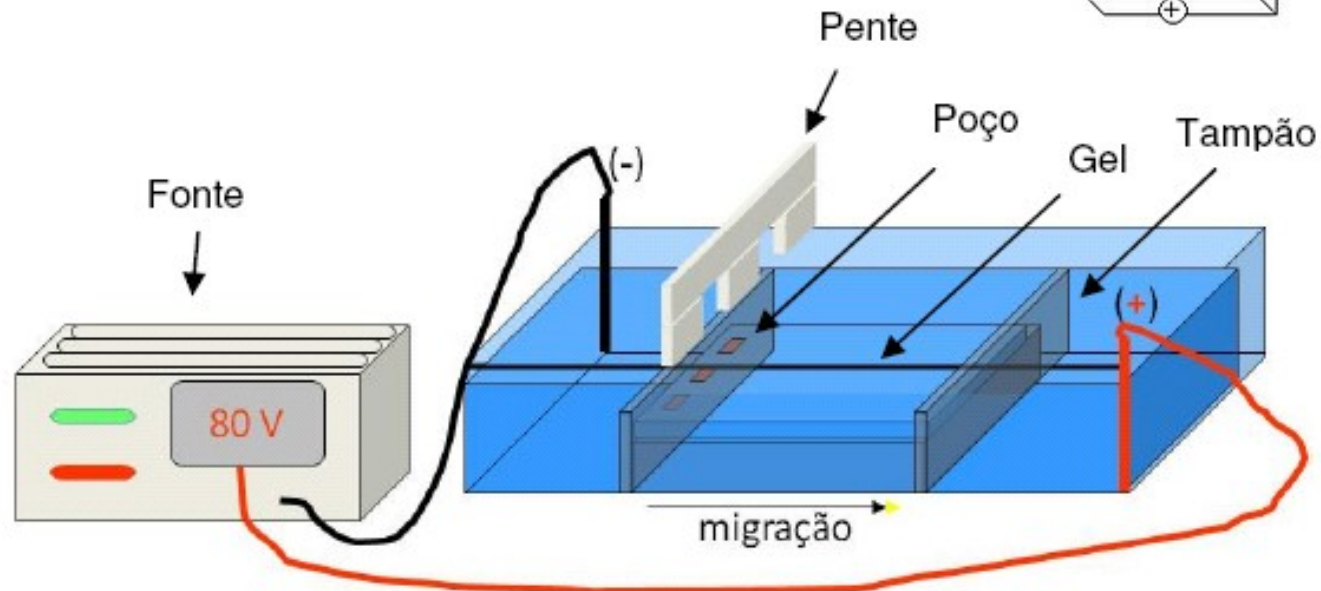
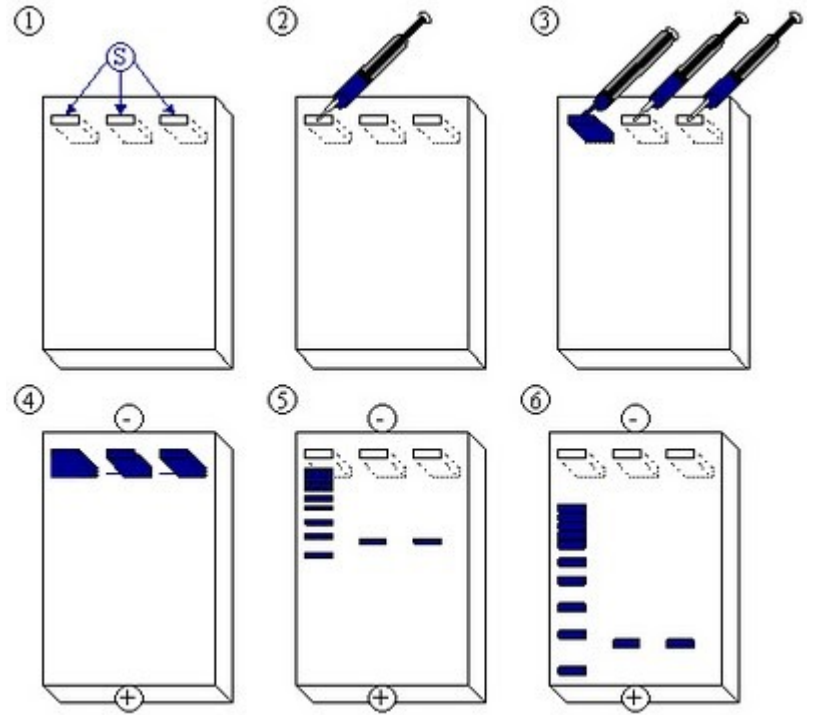
# APLICAÇÃO DAS AMOSTRAS NO GEL



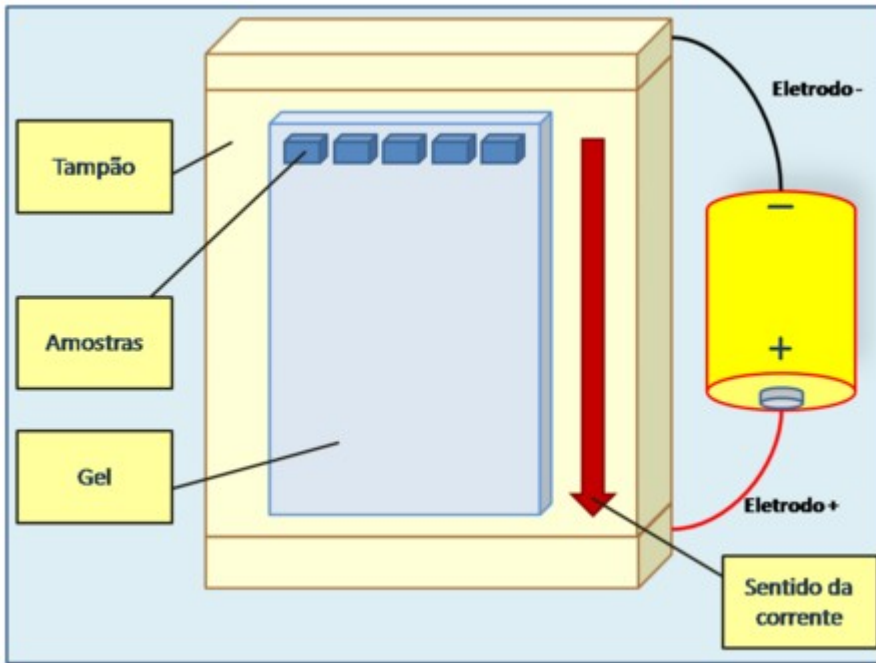
# ELETROFORESE



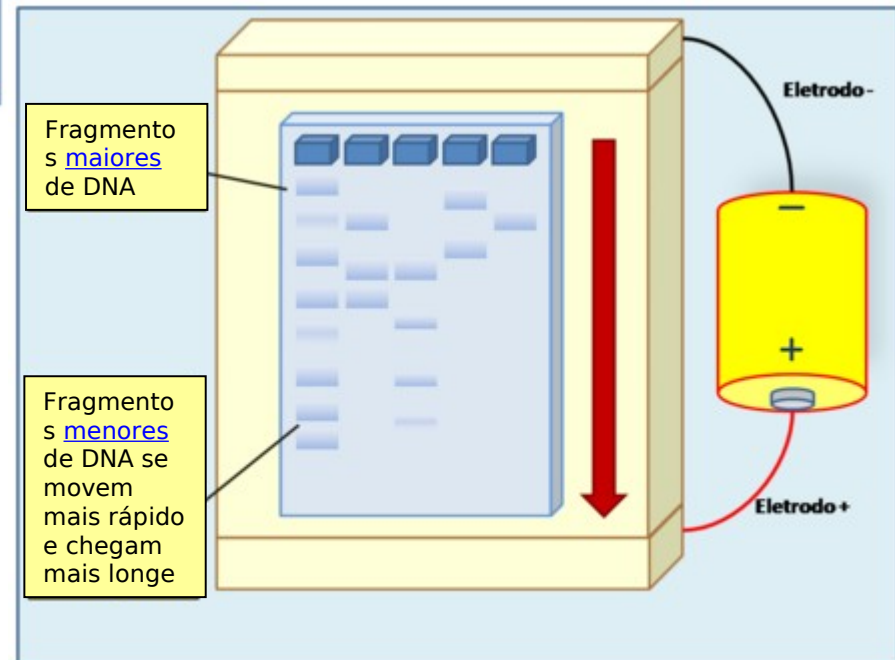
Fonte de eletroforese



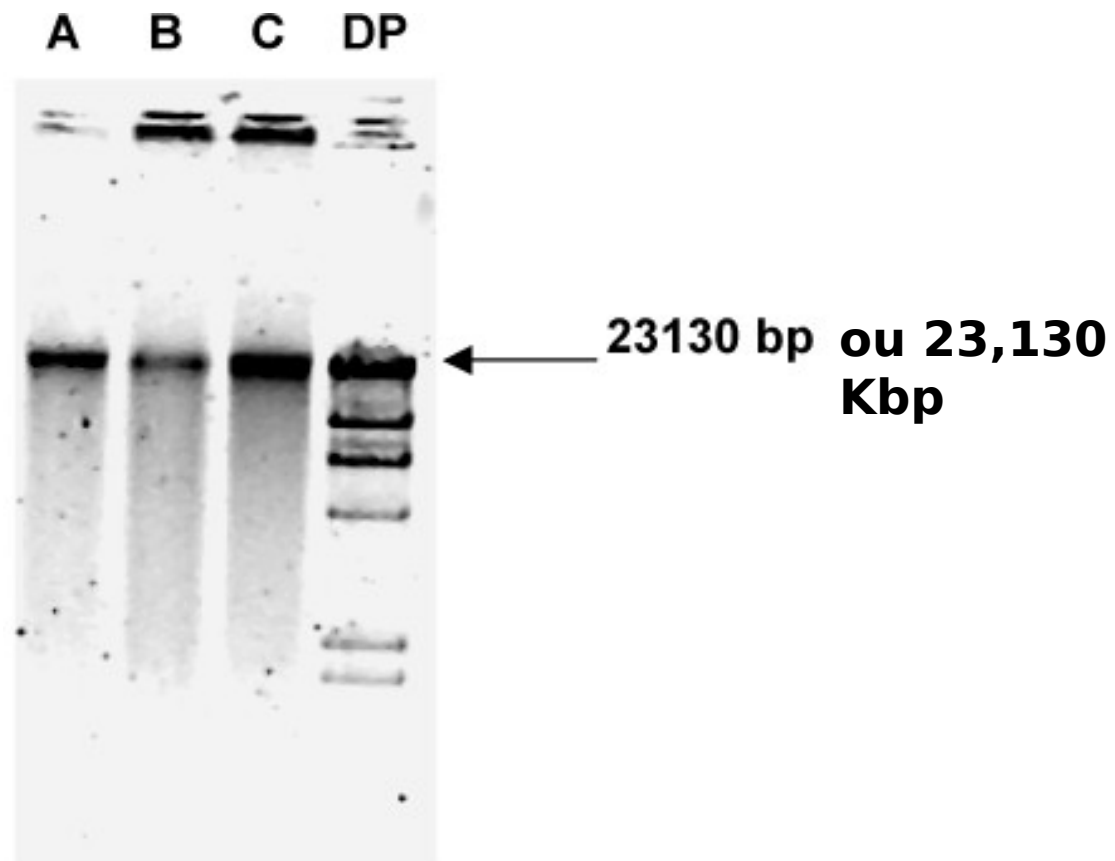
# ELETROFORESE



**DNA sempre migra do polo negativo para o polo positivo!**



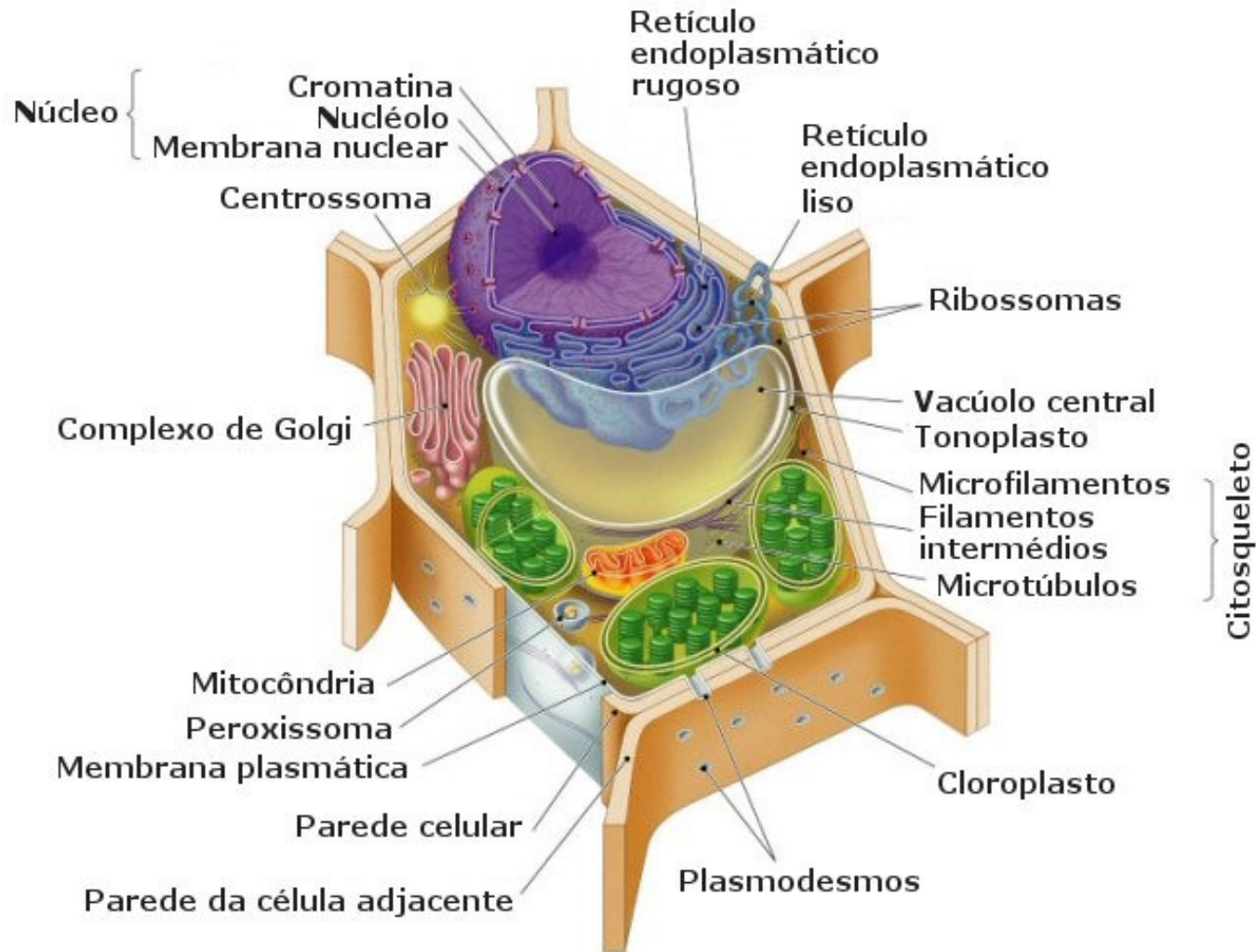
# ANÁLISE DO RESULTADO



**FIGURA 2** - Perfil eletroforético de DNA [1000 ng/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

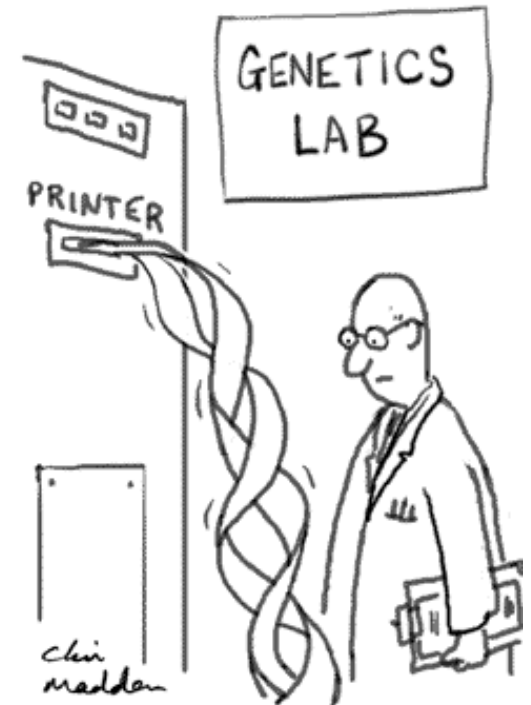
<http://www.dnalc.org/resources/animations/gelectrophoresis.html>



# 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!!!**



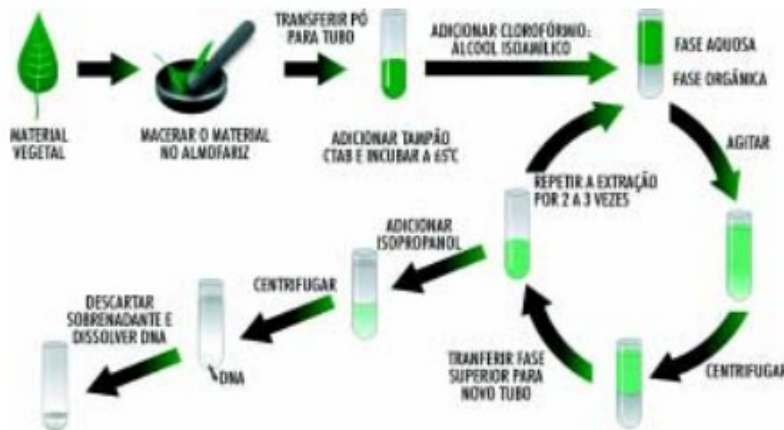


# Extração de DNA de plantas

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

○ 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.