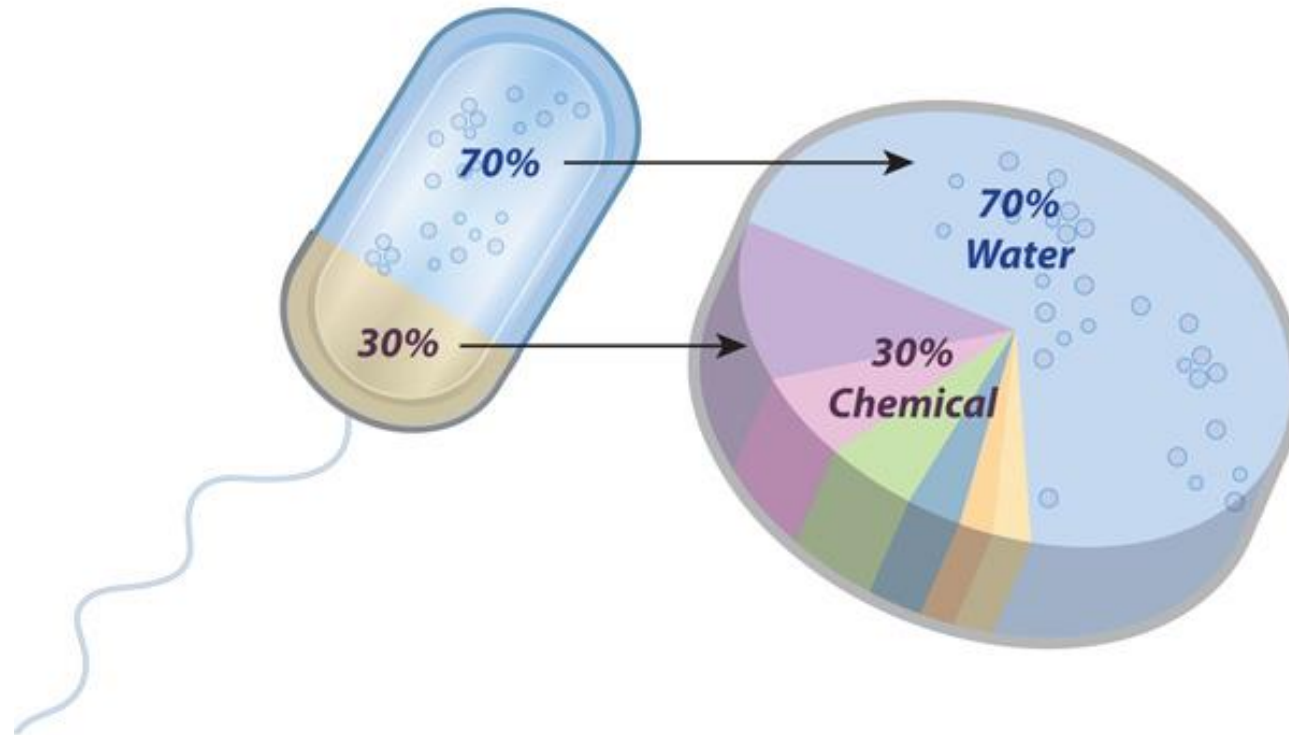


# Extração de DNA bacteriano

# Composição da bactéria



Nature education - Essentials of cell biology

**Table 5.3** Overall composition of an average *Escherichia coli* cell

Substance	% of total dry wt
<b>Macromolecules</b>	
Protein	55.0
RNA	20.4
23S RNA	10.6
16S RNA	5.5
5S RNA	0.4
Transfer RNA (4S)	2.9
Messenger RNA	0.8
Miscellaneous small RNAs	0.2
Phospholipid	9.1
Lipopolysaccharide	3.4
DNA	3.1
Murein	2.5
Glycogen and other storage material	2.5
<b>Total macromolecules</b>	<b>96.1</b>
<b>Small molecules</b>	
Metabolites, building blocks, vitamins, etc.	2.9
Inorganic ions	1.0
<b>Total small molecules</b>	<b>3.9</b>

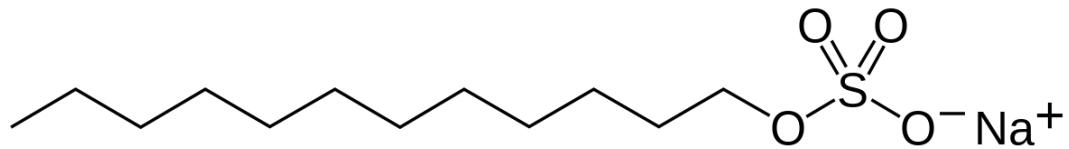
Moselio Schaechter, John L. Ingraham, Frederick C. Neidhardt, *Microbe*, 2006 ASM Press 1 edition p.76 table 5.3

# Protocolo

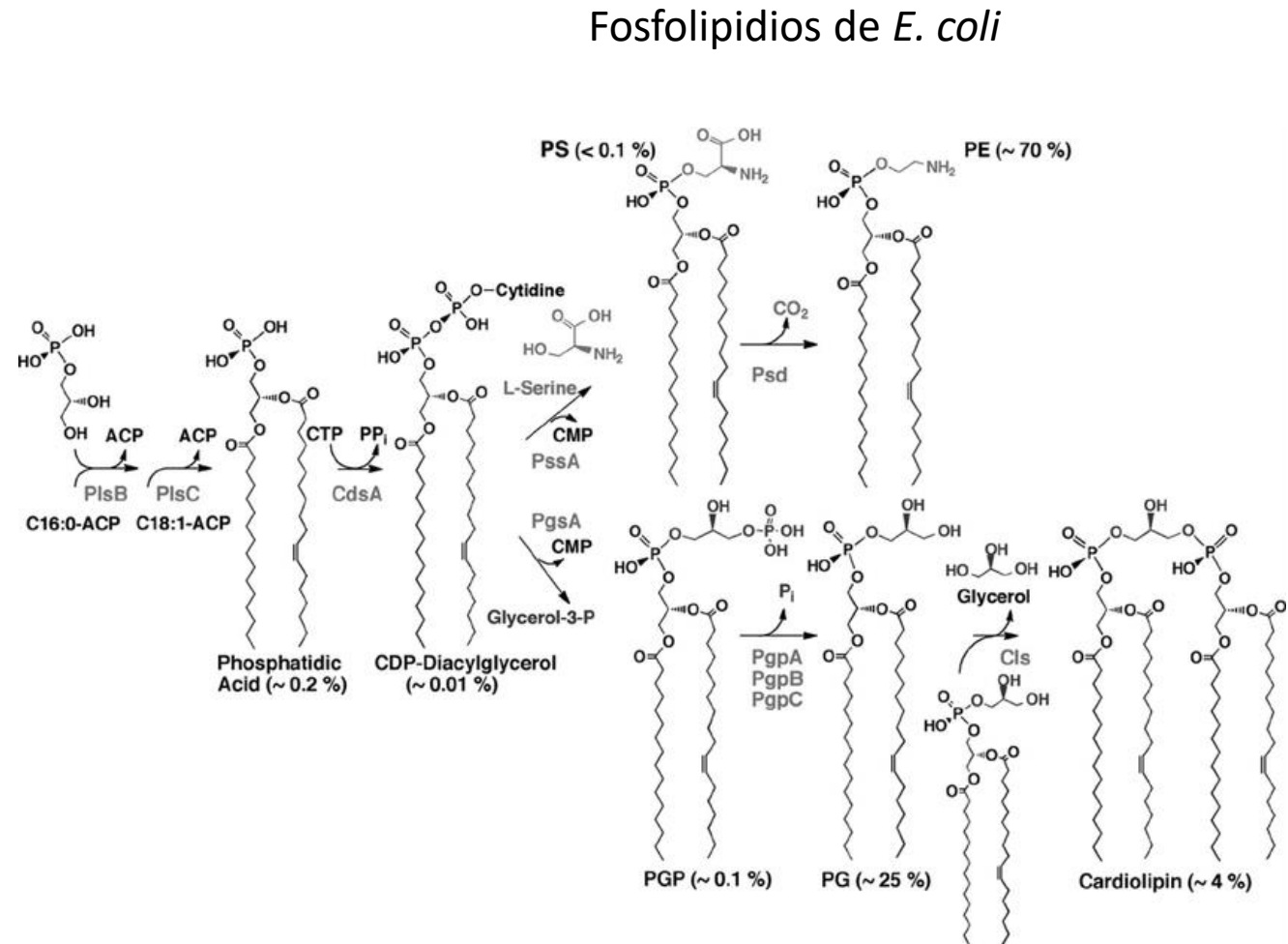
1. Coleta de células por centrifugação.
2. Ressuspender pellet de célula em solução tampão.
  - a) Mantem pH e força iônica
3. Lise: SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

# Lise

- SDS – Dodecil sulfato de sódio



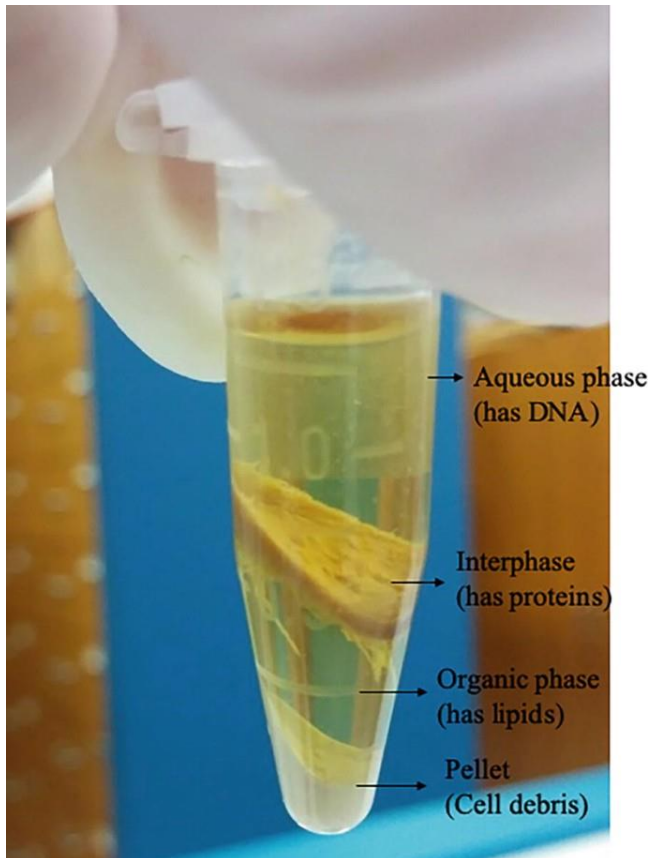
Composto anfipático: contém domínios polares e domínios apolares



# Protocolo

1. Coleta de células por centrifugação.
2. Ressuspender pellet de célula em solução tampão.
  - a) Mantem pH e força iônica
3. Lise: SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
4. Extração do DNA

# Extração do DNA



Gautam, 2022

- Extração padrão:
- Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico
- Fase orgânica: Lipídios
- Interfase: proteínas
- Fase aquosa: ácido nucleico
- Usaremos apenas Clorofórmio-Álcool isoamílico
  - Fenol: perigoso



# Protocolo

1. Coleta de células por centrifugação.
2. Ressuspender pellet de célula em solução tampão.
  - a) Mantem pH e força iônica
3. Lise: SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
4. Extração do DNA
5. Separação das fases – Fase aquosa: DNA

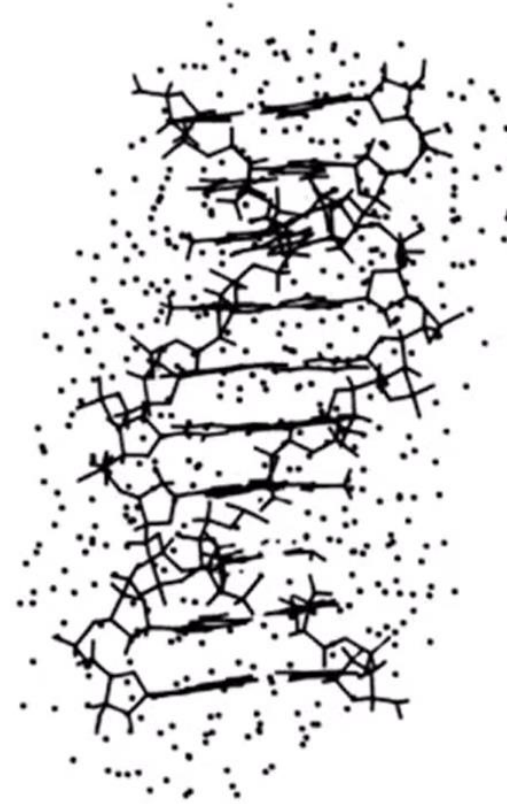
# Protocolo

1. Coleta de células por centrifugação.
2. Ressuspender pellet de célula em solução tampão.
  - a) Mantem pH e força iônica
3. Lise: SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
4. Extração do DNA
5. Separação das fases – Fase aquosa: DNA
6. Tirar DNA da solução: Etanol + cátion
7. Pegar DNA: Spooling

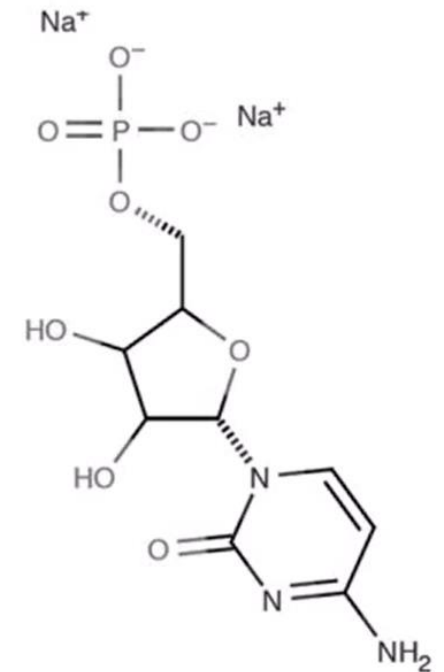


# Precipitação do DNA

- Em solução aquosa o grupo fosfato do DNA interage com a água, mantendo o DNA solúvel interagindo fracamente com os cátions da solução.
- Em solução de etanol, o etanol desloca a água dos grupos fosfatos, dessa maneira tornando o fosfato disponível para interagir com os cátions.
- Há então a neutralização das cargas.
- O DNA descarregado deixa de ter repulsão entre os grupos fosfatos passando a agregar e precipitar.



DNA surrounded by water molecules (hydration shell) in solution

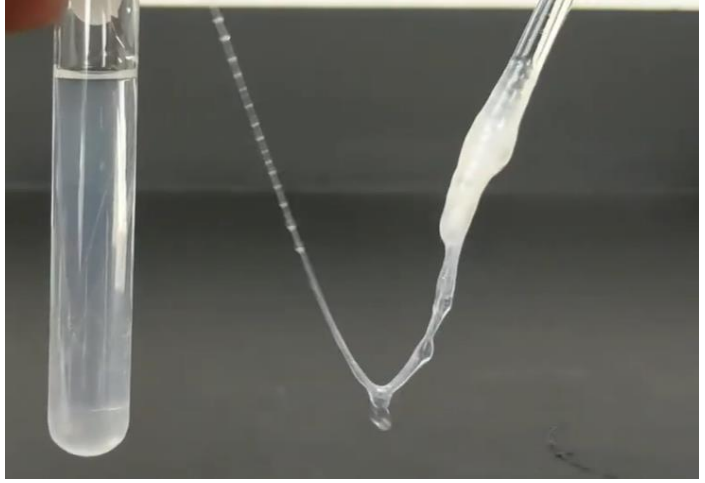
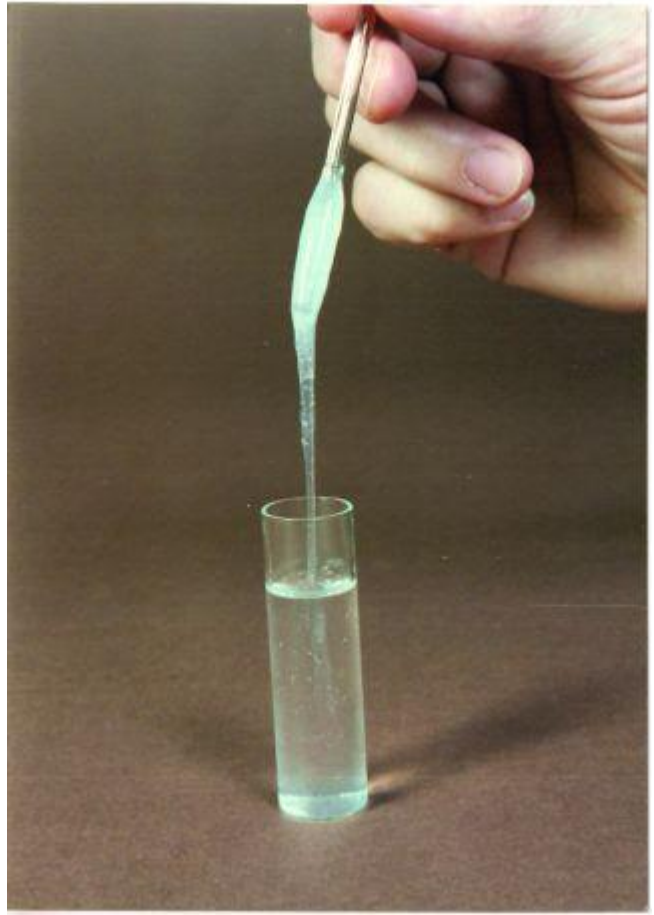
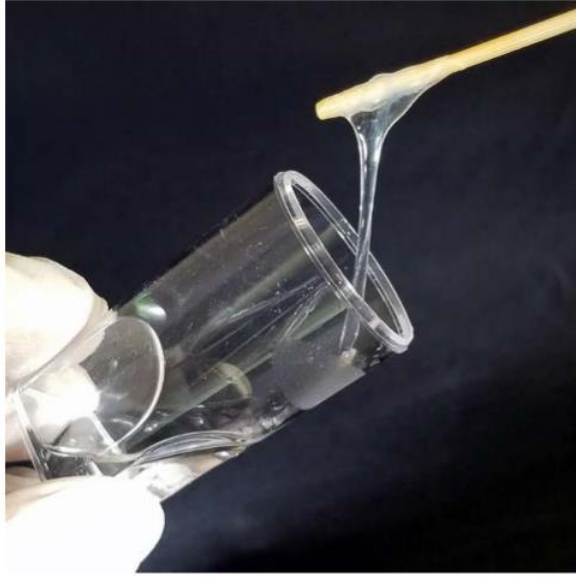


Sodium cations neutralizing a nucleotide.

# Protocolo

1. Coleta de células por centrifugação.
2. Ressuspender pellet de célula em solução tampão.
  - a) Mantem pH e força iônica
3. Lise: SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
4. Extração do DNA
5. Separação das fases – Fase aquosa: DNA
6. Tirar DNA da solução: Etanol + cátion
7. Pegar DNA: Spooling

# Spooling: enrolamento



# Protocolo

1. Coleta de células por centrifugação.
2. Ressuspender pellet de célula em solução tampão.
  - a) Mantem pH e força iônica
3. Lise: SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
4. Extração do DNA
5. Separação das fases – Fase aquosa: DNA
6. Tirar DNA da solução: Etanol + cátion
7. Pegar DNA: Spooling
8. Ressolubilizar DNA: aquecimento em solução aquosa

# Protocolo

1. Coleta de células por centrifugação.
2. Ressuspender pellet de célula em solução tampão.
  - a) Mantem pH e força iônica
3. Lise: SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
4. Extração do DNA
5. Separação das fases – Fase aquosa: DNA
6. Tirar DNA da solução: Etanol + cátion
7. Pegar DNA: Spooling
8. Ressolubilizar DNA: aquecimento em solução aquosa
9. Quantificação: UV

# Como quantificar?

## Lei de Lambert-Beer

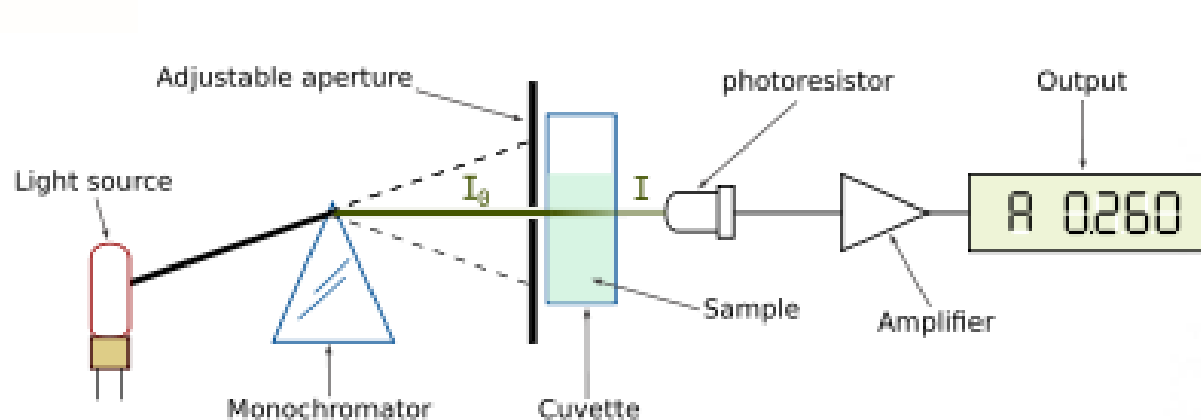
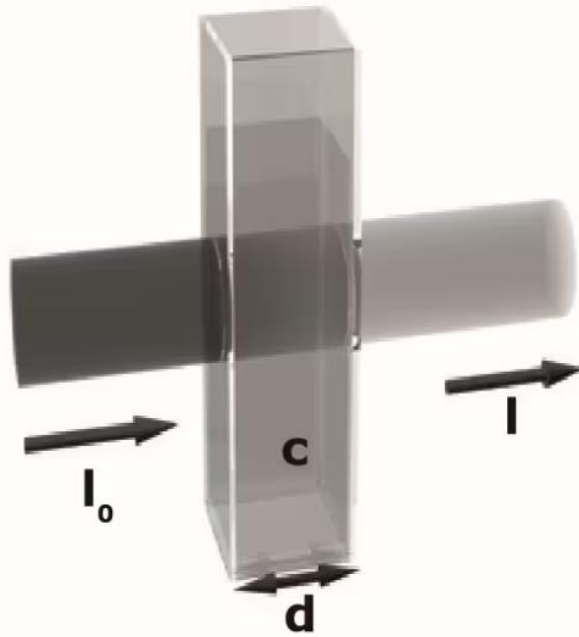
$$A = \epsilon l c$$

A: Absorbância medida

$\epsilon$ : Coeficiente de absorção molar (fator tabelado para cada composto)

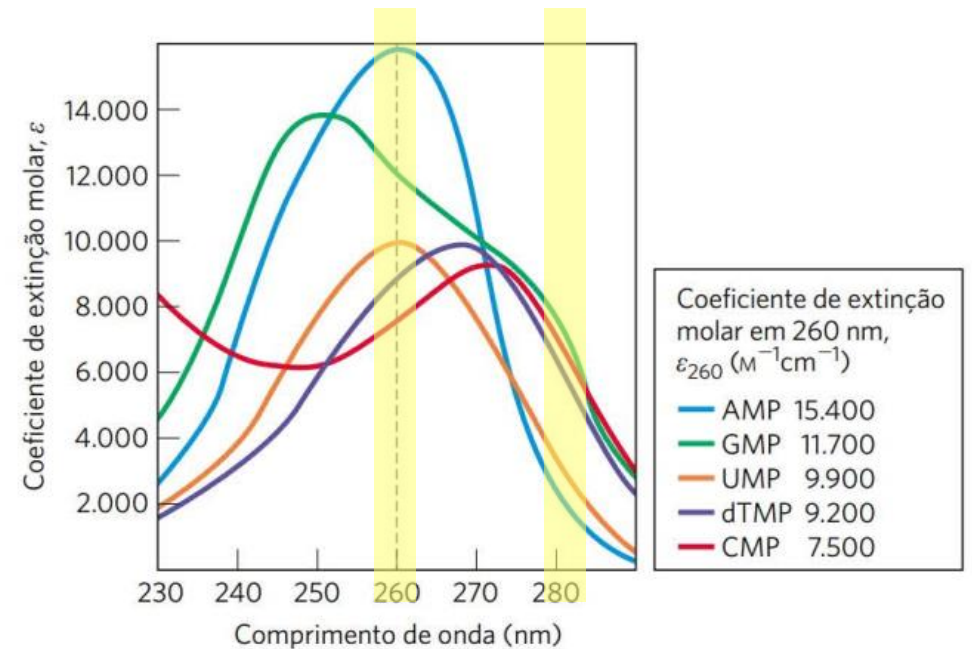
L: distância percorrida (padrão 1cm)

C = concentração



# Relação 260/280nm de cada base

- Guanina: 1.15
- Adenina: 4.50
- Citosina: 1.51
- Uracila: 4.00
- Timina: 1.47



- Para um DNA puro se espera uma absorbância 1,7-2x maior em 260nm em relação a 280nm

# Pureza da amostra

$260_{nm}$

---

$280_{nm}$

Valores altos:

Muito RNA na amostra:

Uracila: 4.00

Timina: 1.47

Valores baixos:

Proteína absorve mais 280nm.

Logo vai reduzir os valores desta relação.



# Quantificação de DNA

$$\mu\text{g/ml} = A_{260} \times \text{Fator Diluição} \times 50.0$$

Valores tabelados de concentração

1 A260 dsDNA = 50  $\mu\text{g/ml}$

1 A260 ssDNA = 37  $\mu\text{g/ml}$

1 A260 ssRNA = 40  $\mu\text{g/ml}$