

2. EXTRAÇÃO DE DNA

João José de Simoni Gouveia

Luciana Correia de Almeida Regitano

A extração dos ácidos nucléicos (DNA e RNA) é o primeiro passo para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. Pode-se obter DNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, e existe uma infinidade de protocolos para realização de tal procedimento. A escolha do protocolo de extração de DNA dependerá de diversos fatores como: tipo de tecido a ser utilizado, grau de pureza e de integridade necessária para a aplicação em que o DNA será utilizado (PCR, seqüenciamento, clonagem gênica, etc.) (Bartlett, 2003).

O primeiro relato sobre isolamento de DNA data de 1869 e foi realizado por Friedrich Miescher, a partir de leucócitos presentes em pus. Miescher lisou estas células com uma solução alcalina e precipitou o material nuclear com solução salina. Este material nuclear que posteriormente seria conhecido como DNA, foi chamado de nucleína (<http://www.dbbm.fiocruz.br/helpdesk/mbiology/historico2004.pdf>, <http://www.dnai.org>).

Basicamente, o processo de extração de DNA consiste em duas etapas. A primeira etapa é a extração propriamente dita e consiste no rompimento das membranas celulares (e conseqüente exteriorização do DNA). A segunda fase consiste na purificação do DNA em solução, ou seja, “retirada” dos outros componentes celulares da solução (restos de membrana, proteínas, RNA) (Romano, 1999).

O rompimento das membranas celulares geralmente é feito com detergentes (SDS ou CTAB). A utilização de agentes caotrópicos como o tiocianato de guanidina

impede o DNA de se ligar nas outras moléculas, facilitando sua separação na segunda fase do processo. Após esta fase, deve-se separar o DNA dos outros componentes celulares. Isto é feito por meio da adição de substâncias que façam com que a solução torne-se heterogênea e que o DNA fique dissolvido em apenas uma das fases, como por exemplo, quando se utiliza fenol para desnaturar as proteínas, ficando o DNA na fase aquosa e as proteínas na interface entre as fases orgânica e aquosa. Uma alternativa à utilização dos solventes orgânicos como o fenol é fazer a separação das proteínas utilizando altas concentrações de sal (*salting-out*). Após separar o DNA dos outros componentes celulares, pode-se proceder uma precipitação do DNA para garantir a máxima pureza do material, esta precipitação geralmente faz-se utilizando álcool (etanol ou isopropanol) que, em presença de cátions monovalentes, promove uma transição estrutural na molécula de ácido nucléico, resultando em agregação e precipitação (Regitano, 2001; Azevedo, 2003; <http://www.etall.hpg.ig.com.br/cursopcr.html>).

Os protocolos abordados neste capítulo são utilizados na rotina do laboratório de Biotecnologia Animal do Centro de Pesquisa de Pecuária do Sudeste e são adaptações dos protocolos descritos em Regitano (2001).

O objetivo deste capítulo é fazer com que o aluno entenda os princípios deste processo, a finalidade de cada reagente em um protocolo de extração de DNA e, a partir daí, possa utilizar e adaptar os protocolos já existentes de acordo com sua necessidade e disponibilidade de reagentes.

2.1. Extração de DNA de Leucócitos

A) Obtenção de Leucócitos

1. Coletar 5mL de sangue em tubos contendo EDTA potássico [50µL de EDTA(K₃) a 15%]

O EDTA é uma substância anticoagulante. Existem outras substâncias com esta finalidade (citrato e heparina), porém se o DNA for utilizado para PCR não se deve utilizar heparina, pois esta substância interfere na atividade da enzima Taq DNA polimerase.

2. Transferir 2,5 mL do sangue para um tubo Falcon de 15mL

3. Adicionar 10mL de Solução A e vortexar até homogeneizar

4. Centrifugar por 10 min a 700 xg

5. Dispensar o sobrenadante

6. Ressuspender o pellet em 5mL de Solução A

7. Vortexar até dissolver completamente o pellet

8. Centrifugar por 10 min a 700 xg

9. Repetir os passos 4 – 9 até obter somente as células brancas (o pellet deve estar branco cremoso).

Resíduos de hemoglobina inibem a reação de PCR

10. Ressuspender o pellet em 500µL de Solução A e transferir para microtubos de 1,5mL

11. Centrifugar 5 min a 16.000 xg e descartar o sobrenadante.

As células brancas assim preparadas podem ser armazenadas entre -20°C e -80°C

B) Extração e purificação do DNA

1. Ressuspender o pellet em 500µL de Solução B
2. Vortexar até o pellet desprender do fundo do tubo
3. Incubar a 55°C por 4-6 horas (ou *overnight*). Vortexar periodicamente durante a incubação para que a dissolução do pellet seja completa

A Solução B contém Tris HCl (pH 8,0) que é uma solução tampão, cuja finalidade é manter o pH constante. Como o pH ótimo para a ação de DNases endógenas é por volta de 7,0, este reagente ajuda a evitar a ação destas nucleases. O SDS é um detergente iônico forte, cuja função é romper as membranas celulares, o EDTA age quelando íons Mg^{2+} e Ca^{2+} (que são co-fatores de diversas enzimas nucleares como as DNases) e a proteinase K hidrolisa as proteínas.

Se houver disponibilidade de um bloco aquecido com agitador (termomixer), deve-se deixar as amostras agitando durante a incubação.

4. Adicionar 210µL de TE (pH 7,6) e 240µL de NaCl 5M

O NaCl fará com que as proteínas precipitem por excesso de íons. O TE é um tampão.

5. Agitar os tubos por inversão até formar pequenos coágulos
6. Incubar em gelo por 10 min
7. Centrifugar por 15 min a 16.000xg

8. Recolher o sobrenadante dividindo-o em dois microtubos de 1,5mL limpos (máximo de 500µL de sobrenadante por tubo)
9. Adicionar 1mL de etanol 100% (absoluto) gelado em cada tubo e misturar por inversão

É fundamental que o volume de etanol corresponda à, no mínimo, 02 vezes o volume da solução para que a precipitação do DNA seja eficiente. Alternativamente, pode-se utilizar 01 volume de isopropanol à temperatura ambiente.

O Álcool torna o meio muito hidrofóbico para o DNA, fazendo com que ele precipite sobre sua própria estrutura.

10. Centrifugar por 15 min a 16.000xg
11. Descartar o sobrenadante
12. Secar em papel
13. Adicionar 500µL de etanol 70% gelado

O álcool 100% faz com que precipitem muitos sais juntamente com o DNA, além de dificultar a ressuspensão do DNA, por isso utiliza-se uma “lavagem” com álcool 70%.

14. Centrifugar por 5 min a 16.000xg
15. Descartar o etanol e secar o pellet
16. Adicionar 250µL de TE+RNase (10µg de RNase por mL de amostra) e incubar por 1h a 37°C

Este protocolo isola juntamente com o DNA uma quantidade considerável de RNA, por isso o tratamento com RNase se faz necessário para remover este contaminante.

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA DE SANGUE UTILIZANDO O KIT GFX

Márcia Cristina de Sena Oliveira

1. Colocar 300 μ L de sangue e 900 μ L de solução de lise em microtubo de 1,5 mL
2. Homogeneizar, centrifugar a 21.000 xg por 5 minutos e descartar o sobrenadante
3. Homogeneizar e adicionar 500 μ L de solução de extração
4. Incubar por 5 minutos à temperatura ambiente e transferir o conteúdo do tubo para a coluna de extração acoplada a um tubo coletor
5. Centrifugar a 5.000 xg por 1 minuto
6. Adicionar à coluna 500 μ L de solução de extração e centrifugar a 5.000 xg por 1 minuto
7. Adicionar à coluna 500 μ L de solução de lavagem e centrifugar a 21.000 xg por 3 minutos
8. Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL, limpo e livre de DNases
9. Adicionar 100 μ L de água bidestilada, autoclavada e aquecida a 70°C. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar a 5.000 xg por 1 minuto