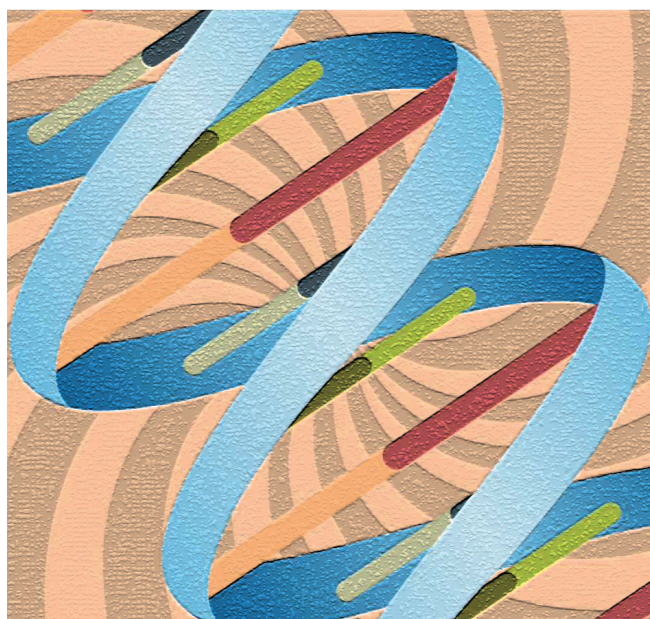


Ilustração: Vitor Lôbo



Metodologia Científica para Extração de DNA de Amostras de Sangue (Aves e Quelônios)

Maria Rosa Travassos da Rosa Costa¹

Introdução

A extração de DNA é o passo primordial para a sua utilização nas diferentes técnicas de marcadores moleculares. Essa etapa é muito importante, já que o DNA deve estar íntegro para que os objetivos sejam alcançados com sucesso. A quantidade de DNA necessária varia conforme o tipo de marcador molecular que será utilizado. Por exemplo, para uma reação de RAPD (Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso) são necessários alguns nanogramas de DNA, enquanto para análise RFLP, são necessárias quantidades de DNA na ordem de microgramas. Existem diferentes protocolos de extração de DNA, com variações de acordo com a espécie em questão e o tecido a ser utilizado, sendo de fundamental importância que o material coletado esteja bem preservado. Após a coleta, o material deve ser submetido a uma solução extratora cujos componentes variam de acordo com o protocolo, devendo conter um tampão para estabilizar o pH, um sal para dissociar as proteínas do DNA, um detergente para solubilizar as membranas e colaborar na atividade enzimática

e um agente inativante de DNases com a função de proteger o DNA genômico.

Esta metodologia foi desenvolvida no Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Amazônia Oriental e promove a extração de DNA íntegro e próprio para utilizar em diferentes técnicas moleculares. O principal ganho da tecnologia é a diminuição do tempo de extração.

A seguir, estão descritos os passos a serem executados:

- Coletar amostras de sangue com EDTA, para evitar coagulação, em tubos de prolipropileno de 15 ml.
- Conservar o material resfriado (-4 °C) até a extração, que deve se proceder no máximo até 3 dias após a coleta.
- Transferir 100 μ l a 150 μ l de cada amostra para tubos de 15 ml identificados.
- Adicionar 4 ml de tampão STE, 250 μ l de CTAB 10% pH 7,2 e 50 μ l de ribonuclease (RNase A 10 mg/ml).
- Adicionar 50 μ l de proteinase K 20 mg/ml e incubar por 1 hora a 55 °C em contínua agitação.
- Misturar levemente em vórtex.

¹ Engenheira-agrônoma, doutora em Genética e Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. mrco@cpatu.embrapa.br

- Levar os tubos à temperatura ambiente e adicionar 1 ml de NaCl 5 M. Agitar gentilmente por 15 segundos. Adicionar 3 ml de clorofórmio e realizar inversão contínua durante aproximadamente 3 minutos.
- Centrifugar em centrífuga refrigerada a 5.000 rpm por 10 minutos.
- Transferir o sobrenadante para tubos de 15 ml e adicionar volume igual de álcool isopropílico 95% gelado (-20 °C).
- Inverter os tubos gentilmente para precipitar o DNA.
- Centrifugar a 5.000 rpm por 5 minutos (4 °C).
- Descartar o álcool.
- Acrescentar 500 µl de álcool etílico a 70% para remover sais.
- Verificar se há ocorrência de impurezas. Se houver, repetir a lavagem com álcool etílico 70%.
- Retirar o álcool e secar na estufa a 55 °C por 1 hora (cuidado para não secar muito).
- Ressuspender o DNA com 300 µl de tampão TE ou água ultrapura.
- Guardar em geladeira a 4 °C até a quantificação.
- Após a quantificação, estocar em freezer -80 °C.



Figura 1. Quantificação das amostras. Nos 3 primeiros poços, encontra-se o DNA de Bacteriófago Lambda com 50 ng, 100 ng e 200 ng, respectivamente.

Soluções utilizadas

1- Tampão de extração STE (1.000 ml)

- 20 ml de NaCl 5M.
- 10 ml de Tris HCl 1M pH 8,0.
- 10 ml de EDTA 0,1M pH 8,0.
- Completar para 1.000 ml e autoclavar por 20 minutos.

2- Solução de NaCl 5M (1.000 ml)

Dissolver 292,2 g de NaCl em 800 ml de água estéril. Ajustar o volume para 1 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames, autoclavar e armazenar a 4 °C.

3- Etanol 70% (1.000 ml)

Diluir 736,8 ml de álcool comercial a 95% em 263,2 ml de água estéril.

4- Tampão de extração TE (100 ml)

- 1 ml de Tris-HCl 1M pH 8,0.
- 1 ml de EDTA 0,1M pH 8,0.
- Completar com água destilada para 100 ml e autoclavar por 20 minutos.

5- CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamonio) 20 % (100 ml)

Adicionar 20 g de CTAB a 80 ml de água estéril. Aquecer até 60 °C a 80 °C para facilitar a dissolução. Ajustar o volume para 100 ml com água estéril. Não é necessário esterilizar. Armazenar à temperatura ambiente.

6- EDTA (dissodium ethylenediaminetetra-acetate 2H₂O) 0,5 M (1 litro)

Adicionar 186,1 g de dissodium ethylenediaminetetra-acetate 2H₂O (EDTA) a 800 ml de água estéril. Agitar vagarosamente em agitador magnético. Mantendo a solução sobre o agitador magnético, ajustar o pH para 8,0 com a adição de NaOH (aproximadamente 20 g de NaOH peletizada). O sal dissódico EDTA não dissolve enquanto o pH da solução não se aproxima de 8,0. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml, esterilizar por autoclavagem e armazenar a -4 °C.

7- Ribonuclease A 10 mg/ml- (1 ml)

Dissolver 10 mg de RNase A em 1 ml de acetato de sódio 0,01M (pH 5,2). Ajustar o pH para 7,4 adicionando Tris HCl 1M pH 8,0. Aquecer até 100 °C por 15 minutos. Deixar esfriar lentamente à temperatura ambiente. Armazenar a -20 °C.

8- Proteinase K – 50 µg/ml – Estoque-20 mg/ml

Solução estoque: é calculada pela fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

Em que:

C_i = concentração inicial (verifica-se a concentração inicial na embalagem do produto).

V_i = Volume inicial (volume inicial a ser pipetado).

C_f = Concentração final (20 mg/ml).

V_f = Volume final (quantidade de solução final que se deseja).

Completa-se para o volume final com tampão TE

(item 4).

Verificar sempre a equivalência das concentrações.

O volume de tampão a ser usado na diluição é obtido pela fórmula:

$(T \times CFP) / (CIP \times 10)^3$, em que:

T = Volume do tampão a ser usado (nº de amostras x 700 μ l + 10 %).

CFP = Concentração final da proteinase (50 μ g/ml).

CIP = Concentração inicial da proteinase (20 mg/ml).

Comunicado Técnico, 228

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Oriental

Endereço: Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.
Caixa Postal 48. CEP 66095-100 - Belém, PA.

Fone: (91) 3204-1000

Fax: (91) 3276-9845

www.cpatu.embrapa.br

sac@cpatu.embrapa.br

1ª edição

Versão eletrônica (2011)

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de Publicação

Presidente: *Michell Olívio Xavier da Costa*

Secretário-Executivo: *Moacyr Bernardino Dias-Filho*

Membros: *Orlando dos Santos Watrin, Márcia Mascarenhas Grise, José Edmar Urano de Carvalho, Regina Alves Rodrigues, Rosana Cavalcante de Oliveira*

Revisão Técnica:

Eduardo R. de C. Pinto – Embrapa Rec. Gen. e Biotecnologia

Rodrigo da Rocha Fragoso – Embrapa Cerrados

Expediente

Supervisão editorial: *Luciane Chedid Melo Borges*

Revisão de texto: *Nairjara de Fátima G. da Silva Pastana*

Tratamento das ilustrações: *Vitor Trindade Lôbo*

Editoração eletrônica: *Vitor Trindade Lôbo*