

06871

CPATU

2001

FL-06871

ISSN 1517-2201



Número, 89

Junho, 2001

Manual de Extração de DNA



Manual de extração de DNA.

2001

FL-06871



31650-1

rapa

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Marcus Vinícius Pratini de Moraes
Ministro

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerhard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Dante Daniel Giacomelli Scolari
Bonifácio Hideyuki Nakasu
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores

Embrapa Amazônia Oriental

Emanuel Adilson de Souza Serrão
Chefe Geral

Miguel Simão Neto
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Antonio Carlos Paula Neves da Rocha
Chefe Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

Célio Armando Palheta Ferreira
Chefe Adjunto de Administração

ISSN 1517-2201

Documentos Nº 89

Junho, 2001

MANUAL DE EXTRAÇÃO DE DNA

Maria Rosa Costa
Elisa Ferreira Moura

Embrapa

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:
Embrapa Amazônia Oriental
Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n
Telefone: (91) 299-4544
Fax: (91) 276-9845
e-mail: cpatu@cpatu.embrapa.br
Caixa Postal, 48
66095-100 – Belém, PA

Tiragem: 300 exemplares

Comitê de Publicações

Leopoldo Brito Teixeira – Presidente
Antonio de Brito Silva
Expedito Ubirajara Peixoto Galvão
Joaquim Ivanir Gomes

José de Brito Lourenço Júnior
Maria do Socorro Padilha de Oliveira
Nazaré Magalhães – Secretária Executiva

Revisores Técnicos

Osmar Alves Lameira – Embrapa Amazônia Oriental
Milton Kanashiro – Embrapa Amazônia Oriental

Expediente

Coordenação Editorial: Guilherme Leopoldo da Costa Fernandes
Normalização: Lucilda Maria Sousa de Matos
Revisão Gramatical: Maria de Nazaré Magalhães dos Santos
Composição: Euclides Pereira dos Santos Filho

COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).

ISSN 1517-2201

1. DNA – Extração. 2. Genética vegetal. 3. Identificação. I. Embrapa. Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (Belém, PA). II. Título. III. Série.

CDD: 581.873282

LISTA DE ABREVIATURAS:

PCR = Polimerase chain reaction (Reação de polimerase em cadeia)

DNA = ácido desoxirribonucleico

RNAse = ribonuclease

ng = nanograma

μg = micrograma

μl = microlitros

Sumário

INTRODUÇÃO	7
EXTRAÇÃO DE DNA	8
PROTOCOLO 1	9
PROTOCOLO 2	10
QUANTIFICAÇÃO VISUAL DE DNA EM GEL DE AGAROSE	12
DILUIÇÃO DO DNA LAMBDA	13
QUANTIFICAÇÃO	14
ELETROFORESE	14
INTERPRETAÇÃO DO GEL	14
DILUIÇÃO DO DNA GENÔMICO QUANTIFICADO	16
SOLUÇÕES BÁSICAS PARA BIOLOGIA MOLECULAR	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

MANUAL DE EXTRAÇÃO DE DNA

Maria Rosa Costa¹
Elisa Ferreira Moura²

INTRODUÇÃO

A extração de DNA é o primeiro passo para utilizá-lo em técnicas moleculares. Neste aspecto, a qualidade e integridade do DNA são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores. Existem diferentes protocolos de extração de DNA que variam em função da espécie e do tecido a ser utilizado. A maneira de coletar e acondicionar o tecido, assim como o estado do mesmo são fundamentais para o sucesso da extração. Um dos aspectos importantes é que a quantidade de DNA necessária varia em função da técnica molecular a ser utilizada. No caso de uma reação de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), por exemplo, são necessários somente alguns nanogramas de DNA, e para análise de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) são necessárias quantidades de DNA na ordem de microgramas (Bered, 1998).

Normalmente os componentes da solução extratora variam de acordo com o protocolo utilizado, sendo que cada solução deve conter um tampão para estabilizar o pH; um sal para dissociar as proteínas, um detergente para solubilizar as membranas e um agente inativante das DNAses cuja função é proteger o DNA genômico.

Após a extração, torna-se necessário quantificar o DNA para verificar a quantidade e a ocorrência de degradação no mesmo. Entre as técnicas disponíveis para estimar a

¹Eng.-Agr., M.Sc., Pesquisadora Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-790, Belém, PA. E-mail: mrco@cpatu.embrapa.br

²Bolsista CNPq/Embrapa.

concentração de DNA, as mais utilizadas são a leitura em espectrofotômetro e a análise comparativa em gel de agarose corado com brometo de etídio. Este manual abordará somente a quantificação de DNA em gel de agarose.

Este trabalho tem como objetivo descrever as metodologias utilizadas no Laboratório de Genética-LABGEN, da Embrapa Amazônia Oriental, para a extração de DNA, a partir de folhas de espécies vegetais, levando-se em consideração as peculiaridades observadas. É uma abordagem prática, sendo que os protocolos apresentados são passíveis de alteração pelo usuário, conforme as particularidades do seu trabalho, e necessitam do máximo de critério para a execução.

EXTRAÇÃO DE DNA

No processo de caracterização genética das espécies, utilizando-se técnicas moleculares, uma das etapas principais é a extração de DNA, já que qualquer problema na mesma compromete os passos subseqüentes. Por outro lado, o êxito nesta etapa depende de vários fatores, como: a adequação do protocolo, o estado vegetativo do material e, sobretudo, o manuseio de utensílios de maneira adequada para evitar contaminação. A seguir, serão descritas as etapas utilizadas no Laboratório de Genética da Embrapa Amazônia Oriental para a otimização dos protocolos de extração de DNA de espécies vegetais utilizando tecido fresco (folhas). O protocolo 1 é adaptado de Doyle & Doyle (1987) e o protocolo 2 é adaptado de Nelson (1993). As alterações realizadas nos protocolos objetivaram otimizá-los para as espécies e o tecido que se utiliza no laboratório de genética.

PROTOCOLO 1

- Coletar folhas médias, de plantas saudáveis, em bom estado vegetativo. Deve-se utilizar de preferência material recém coletado, acondicionado em sacos de plástico identificados e colocado em isopor com gelo;
- Congelar previamente cadinho e pistilo de porcelana;
- Lavar as folhas em água corrente;
- Lavar as folhas em solução de hipoclorito de sódio a 50% durante 1 minuto;
- Lavar as folhas em água destilada pura;
- Cortar as folhas com tesoura ou vasador, evitando sempre as nervuras;
- Macerar em almofariz com nitrogênio líquido. Esta etapa não deve ser demorada, para evitar oxidação do material, devendo ser realizada em um intervalo de 2 a 3 minutos, no máximo;
- Transferir o material para tubos eppendorfs de 1,5 ml, identificados;
- Acrescentar 650 μ l de tampão de extração completo em cada eppendorf;
- Agitar levemente;
- Levar para banho-maria a 60° C, durante uma hora. Agitando de 10 em 10 minutos;
- Retirar do banho-maria e acrescentar 650 μ l de clorofórmio: álcool isoamil (24:1), em cada eppendorf. Agitar fortemente para formar uma emulsão;
- Centrifugar durante 10 minutos (4° C 12.000 rpm);

- Transferir o sobrenadante para outro eppendorf e acrescentar 650 μ l de clorofórmio: álcool isoamil (24:1) e 200 μ l de tampão de extração sem proteinase K. Repetir o item anterior;

- Retirar 500 μ l do sobrenadante e acrescentar um volume igual de isopropanol gelado, agitar gentilmente para precipitar o DNA. Nesta etapa visualiza-se uma solução esbranquiçada;

- Deixar no freezer (20°) durante 20 minutos;

- Centrifugar durante 10 minutos (4° C e 12.000 rpm);

- Retirar todo o líquido do eppendorf e acrescentar 1.000 μ l de etanol 70 % para remover sais;

- Centrifugar durante 10 minutos (4° C e 12.000 rpm);

- Verificar se há ocorrência de impurezas (resíduo vegetal e outras). Se houver, repetir a lavagem com etanol 70%;

- Retirar o líquido e deixar secando em temperatura ambiente, por um período aproximado de doze horas;

- Ressuspende o DNA com 20 a 50 μ l de RNase / TE (10 μ g.ml⁻¹);

- Deixar na estufa ou banho maria a 37° C durante uma hora;

- Guardar em geladeira a 4° C até a quantificação;

- Estocar em freezer (-20° C).

PROTOCOLO 2

- Coletar amostras de tecido fresco, colocando-as em envelopes de papel identificados. Colocar os envelopes em nitrogênio líquido;

- Congelar previamente cadinhos e pistilos de porcelana (-20 °C);

- Colocar nitrogênio líquido no cadinho, quebrar o tecido já congelado dentro do envelope e transferir para o cadinho. O tecido não deve descongelar;

- Transferir o material para tubos de eppendorf previamente identificados;

- Aquecer o tampão de extração a 65 °C. Acrescentar 2-mercaptoetanol, PVP e proteinase K. Adicioná-lo aos tubos na proporção de 700 µl;

- Misturar levemente em vórtex;

- Incubar os tubos a 65°C (banho-maria) por 20 minutos, invertendo os tubos a cada 10 minutos;

- Retirar do banho-maria e acrescentar 700 µl de clorofórmio/álcool isoamil (24:1). Tampar e agitar fortemente para formar uma emulsão;

- Centrifugar por 10 minutos (4 °C e 12.000 rpm);

- Transferir o sobrenadante e adicionar volume igual de álcool 95% congelado;

- Inverter os tubos gentilmente para precipitar o DNA;

- Colocar em 20° C por 60 minutos ou durante a noite;

- Retirar todo o líquido do eppendorf e acrescentar 1.000 µl de etanol 70 % para remover sais;

- Centrifugar durante 10 minutos (4 °C e 12.000 rpm);

- Verificar se há ocorrência de impurezas (resíduo vegetal e outras). Se houver, repetir a lavagem com etanol 70%;

- Retirar o líquido e deixar secando em temperatura ambiente, por um período aproximado de doze horas;
- Ressuspender o DNA com 20 a 50 μl de RNase (10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), sendo o volume de acordo com a medusa observada;
- Incubar em 65° C até dissolver durante uma hora, mexendo o eppendorf de dez em dez minutos;
- Guardar em geladeira a 4 °C até a quantificação;
- Estocar em freezer -20 °C.

QUANTIFICAÇÃO VISUAL DE DNA EM GEL DE AGAROSE

Após o processo de extração, torna-se necessário proceder a quantificação, para verificar a quantidade de DNA obtida, que é uma etapa fundamental para a eficiência da reação de PCR (reação de polimerase em cadeia). Este procedimento é necessário porque a concentração de DNA inadequada implicará em falhas nas etapas subsequentes. O DNA em excesso na reação RAPD pode resultar na falha completa da reação, devido a alta concentração de impurezas agregadas, ou perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas. Por outro lado, a baixa concentração de DNA resultará em amplificação errada ou não amplificação de certos segmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (Ferreira&Grattapaglia,1996). Vale ressaltar que a quantidade de DNA obtida, varia em função do genoma e da eficiência do protocolo de extração utilizado. Após a quantificação e qualificação do DNA, devem ser feitas soluções de trabalho adequadas à concentração exigida no protocolo que será utilizado.

DILUIÇÃO DO DNA LAMBDA

Geralmente utiliza-se como padrão o DNA lambda intacto, fazendo a diluição para uma concentração de trabalho. É importante que se aplique no gel quantidades crescentes de DNA padrão, que cubram o intervalo de concentração no qual espera-se que as amostras se enquadrem. Pode-se utilizar também lambda cortado com a enzima de restrição Hind III . Nesse caso, calcula-se a quantidade de DNA em cada banda (fragmento de restrição) a partir da informação do seu mapa de restrição.

Exemplo de diluição do DNA lambda sem corte:

Concentração estoque do DNA lambda $0,40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$
= $400 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (verificar a concentração na embalagem).

Então se dilui pela fórmula:

$$C.V = C_1V_1$$

Onde: C = concentração estoque;
V = volume de DNA estoque a ser pipetado;
C₁ = concentração de trabalho e
V₁ = volume final de solução.

$$400 \text{ ng}/\mu\text{l} .V = 10 \text{ ng}/\mu\text{l} .500 \mu\text{l}$$

$$V = 12,5 \mu\text{l} \text{ de DNA lambda estoque} \\ 487,5 \mu\text{l} \text{ de TE pH } 8,0$$

Pode-se diluir para diversas concentrações como $50 \text{ ng}/\mu\text{l}$, $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Utilizam-se normalmente três concentrações no início do gel para comparação.

QUANTIFICAÇÃO

O volume da solução de DNA a ser quantificado é aplicado no gel, geralmente, utiliza-se de 2 a 5 μ l (microlitros) da solução estoque, dependendo da quantidade total de DNA obtida na extração. Esta pode ser empiricamente julgada pela quantidade de precipitado obtido e pela viscosidade da solução onde o DNA está ressuspenso.

Prepara-se o DNA na seguinte concentração:

Amostras	DNA (μ l)	Tampão de carregamento (μ l)	Água estéril (μ l)
Genótipo 1	5	2	4
Genótipo 2	5	2	4
Genótipo 3	5	2	4
Genótipo 4	5	2	4

ELETROFORESE

É a migração de moléculas carregadas em um campo elétrico, que é determinada pelo tamanho da molécula e sua carga. A movimentação ocorre através de um gel que funciona como filtro, separando as moléculas. A separação dos fragmentos depende da concentração da agarose, do tamanho do fragmento e da voltagem aplicada durante a eletroforese. Vale lembrar que esses fatores são interligados, ou seja, uma concentração inadequada de agarose afetará a mobilização das moléculas e assim por diante.

INTERPRETAÇÃO DO GEL

Observar a intensidade das bandas dos genótipos em relação à intensidade das concentrações padrão de lambda.

Quando não se utiliza RNase, observa-se uma linha de RNA na parte inferior do gel (Figura 1).

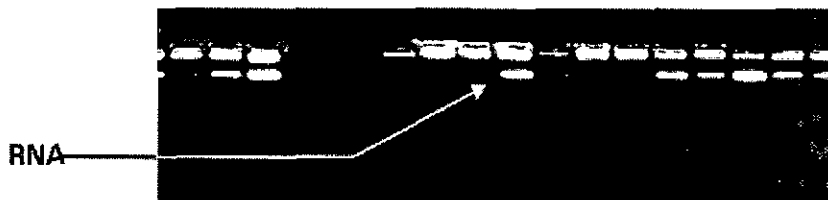


Figura1. DNA genômico com presença de RNA.

É importante avaliar a qualidade do DNA: o DNA das amostras não deve migrar no gel, se fragmentos de DNA ocorrerem ao longo da linha da canaleta, o DNA está degradado. Normalmente a degradação ocorre pelo manuseio inadequado, período de armazenamento muito longo, armazenamento inadequado entre outros fatores. Quanto mais DNA ocorrer ao longo da linha, maior é a degradação. Amostras de DNA com razoável degradação devem ser descartadas (Figura 2).



Figura 2. PCR com DNA genômico degradado.

DILUIÇÃO DO DNA GENÔMICO QUANTIFICADO

Após a quantificação, o DNA é diluído pela fórmula $C.V = C_1.V_1$, onde:

C = é a concentração lida de DNA;

V = é o volume a ser pipetado do DNA concentrado;

C_1 = é a concentração de trabalho;

V_1 = é o volume final correspondente entre 500 μl a 1.000 μl .

Exemplo da diluição do DNA genômico de mandioca para a concentração de 5 ng/ μl :

$$C.V = C_1.V_1$$

$$313 \text{ ng } /\mu\text{l}. V = 5 \text{ ng } /\mu\text{l}.500 \mu\text{l}$$

$$V = \frac{5 \cdot 500}{313}$$

$$V = 8 \mu\text{l de DNA}$$

492 μl de Água estéril

Exemplo da diluição do DNA genômico de mandioca para a concentração de 2,5 ng / μl :

$$C.V = C_1.V_1$$

$$313 \text{ ng } /\mu\text{l}.V = 2,5 \text{ ng } /\mu\text{l}.500 \mu\text{l}$$

$$V = \frac{2,5 \cdot 500}{313}$$

$$V = 4 \mu\text{l de DNA}$$

496 μl de Água estéril

Neste item estão descritos os recursos mínimos necessários para se desenvolver a extração de DNA:

Água estéril para o preparo das soluções;

Agitador magnético com aquecimento;

Autoclave;

Banho-maria;

Balança eletrônica;

Centrífuga refrigerada;

Estufa com temperatura regulável;

Freezer (- 20° C);

Forno de microondas;

Máquina de fazer gelo em escama;

Minicubas para quantificação de DNA;

Pipetas automáticas (20 μ l, 50 μ l, 200 μ l e 1.000 μ l);

Potenciômetro;

Refrigerador dúplex;

Vórtex;

Utensílios de laboratório (vidrarias, bandejas, eppendorfs, ponteiras, luvas, almofarizes, pistilos, espátulas, tesouras, máscaras, suporte para eppendorfs, suporte para pipeta, suporte e tubos de polipropileno, dentre outros).

SOLUÇÕES BÁSICAS PARA BIOLOGIA MOLECULAR

Neste item estão descritas as soluções de uso corrente na biologia molecular, para extração e quantificação de DNA em gel de agarose. Vale ressaltar os cuidados necessários durante o preparo de soluções:

Ter sempre soluções estoque (com frascos devidamente identificados com pH e data);

As mesmas devem ser trocadas com aproximadamente seis meses de preparo;

Para o preparo das soluções utilizar sempre água estéril;

Após pesar os reagentes, nunca completar imediatamente com água para o volume final. Deve-se primeiro corrigir o pH para depois completar o volume;

Nunca manipular eppendorfs contendo DNA sem luva para evitar a degradação do mesmo;

Uma solução 1M = P.M. do reagente para 1 litro de solução.

BROMETO DE ETÍDIO (10 mg/ml)

Adicionar 1g de brometo de etídio a 100 ml de água estéril. Agitar vigorosamente em agitador magnético, até ter certeza de que o corante esteja dissolvido.

Armazenar em temperatura ambiente, em recipiente de cor escura ou envolvido em folha de alumínio.

Obs: O brometo de etídio é um poderoso mutagênico e moderadamente tóxico. Durante o uso deste produto, ou solução que o contenha, é recomendável o uso de luvas e, para a pesagem, deve-se utilizar máscaras apropriadas. Após o uso deste produto todos os recipientes devem ser descontaminados utilizando-se métodos apropriados.

BROMOPHENOL BLUE (AZUL DE BROMOFENOL) –TAMPÃO DE CARREGAMENTO (10ml)

Adicionar 0,042 g de azul de bromofenol a 7,0 ml de TAE 1x e 3,0 ml de glicerol. Estocar em temperatura ambiente.

CLOROFÓRMIO: ÁLCOOL ISOAMIL (24:1)

Juntar 24 partes de Clorofórmio a uma parte de Álcool isoamil.

CTAB (BROMETO DE HEXADECILTRIMETILAMONIO) 20% -100 ml

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

ETANOL 70 % (1000 ml)

Diluir 736,8 ml de álcool comercial a 95 % em 263,20 ml de água estéril.

EDTA (DISSODIUM ETHYLENEDIAMINETETRA-ACETATE 2H₂O) 0,5 M (1,0 litro)

Adicionar 186,1g 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.

GEL DE AGAROSE A 1,0 % PARA QUANTIFICAÇÃO

Pesar 1,0 g de agarose e diluir em 100 ml de TBE 1X (trizma-base 0,1 M; ácido bórico 1M e EDTA 0,5 M) ou TAE 1X (trizma-base 0,1M; ácido acético glacial 1M e EDTA 0,5M). Dissolver em microondas até a solução ficar límpida. Adicionar de 2 µl a 3 µl de brometo de etídio a 10 mg/ml e usar na quantificação após o gel solidificar.

PROTEINASE K - 50 µg/ml – ESTOQUE-20 mg/ml :

A quantidade de tampão a ser usada na diluição é obtida pela fórmula:

$$(T \times CFP) / (CIP \times 10)^3 \text{ onde:}$$

T = Volume do tampão a ser usado (N. de amostras x 700 µl + 10 %);

CFP = Concentração final da proteinase (50 µg/ml);

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

RIBONUCLEASE A 10 mg/ml-1ml (SOLUÇÃO ESTOQUE)

Dissolver 10 mg de RNase A em 1,0 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 em temperatura ambiente. Armazenar a -20 °C.

RIBONUCLEASE A 10 µg/ml EM TAMPÃO TE – 1ml

Juntar 10 µl de Tris HCl 1M pH 8,0, 2 µl de EDTA 0,5 M pH 8,0, 1 µl de RNase (10 mg/ml) e 987 µl de água estéril. Armazenar a 4 °C.

SOLUÇÃO DE NaCl 5M (1,0 litro)

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.

SOLUÇÃO DE NaCl 0,25 M (1,0 litro)

Dissolver 14,61 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.

SDS(SULFATO DODECIL DE SÓDIO) 20%

Dissolver 20 g de SDS em 90 ml de água estéril. Aquecer em temperatura de 68° C para facilitar a dissolução. Ajustar o volume para 100 ml com água estéril. Armazenar a 4 °C. Não é necessário esterilizar.

TAE (TRIS-ACETATO) 50x (SOLUÇÃO ESTOQUE) – POR LITRO

Juntar 242,0 g de Tris base, 57,1ml de ácido acético glacial e 100 ml de 0,5 M EDTA (pH 8,0). Completar o volume com água estéril e armazenar a 4 °C.

TAE (TRIS ACETATO) 1x (SOLUÇÃO DE TRABALHO) – 500 ml

Juntar 490 ml de água estéril a 10 ml de TAE 50x. Armazenar em temperatura ambiente ou a 4 °C para um período mais longo.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO 1 -100 ml

Juntar 2g de CTAB (ou 10 ml de CTAB 20%), 28 ml de NaCl 5M, 4 ml de EDTA 0,5M pH 8,0, 10 ml de Tris-HCl 1M pH 8,0 e 1,0 g de PVP. Completar o volume com água estéril e armazenar em temperatura ambiente.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO 1 COMPLETO

Juntar 50 µl de mercaptoetanol e 53 µl de proteinase K em 25 ml de tampão. Deixar em temperatura ambiente. Preparar na hora de fazer a extração. Não estocar.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO 2- 50 ml

Juntar 5 ml de NaCl 5M, 5ml de tris Hcl 1M, 10 ml de EDTA 0,25 ml e 3,12 ml de SDS 20 %. Completar o volume com água estéril e armazenar em temperatura ambiente.

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO 2 COMPLETO

Adicionar 0,19 g de bissulfito de sódio ao tampão e ajustá-lo de maneira que fique com pH entre 7,8 - 8,0, utilizando NaOH ou ácido acético glacial. Deixar em temperatura ambiente. Aquecer o tampão em 65° C.

TBE (TRIS - BÓRICO) 5X PARA 1000 ml (SOLUÇÃO ESTOQUE)

Pesar 54 g de Tris base (PM 121,1) , 27,5 g de ácido bórico e 20 ml de EDTA 0,5 M (pH = 8,0) e dissolver em água estéril. Completar o volume para 1.000 ml e armazenar à temperatura ambiente.

TBE (TRIS BÓRICO) 1X PARA 500 ml (SOLUÇÃO ESTOQUE)

Diluir 100 ml de solução estoque 5X em 400 ml de água estéril. Armazenar em temperatura ambiente.

TE pH 8,0 – 100 ml

Juntar 1,0 ml de Tris HCl 1M em pH 8,0 (10 mM), 0,2 ml de EDTA 0,5M em pH 8,0 (1mM), completar com água estéril e armazenar em temperatura ambiente.

TRIS 1M (pH 8,0) (1 litro)

Dissolver 121,1 g de Tris base em 800 ml de água estéril. Ajustar o pH para 8,0 adicionando aos poucos aproximadamente 42 ml de HCl concentrado. Aguardar a solução esfriar até a temperatura ambiente antes de fazer o ajuste final do pH.

Ajustar o volume da solução para 1,0 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml e esterilizar por autoclavagem. Armazenar em temperatura ambiente.

Ao final, se a solução apresentar-se com coloração amarelada, descarte-a e obtenha Tris de melhor qualidade.

O pH da solução de Tris é dependente da temperatura e decresce aproximadamente 0,03 unidades de pH para cada aumento de 1°C de temperatura. Por exemplo, uma solução de 0,05 molar tem valores de pH 9,5, 8,9 e 8,6 a 5 °C, 25 °C e 37 °C, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERED, F. Extração de DNA – considerações e prática. In: MILACH, S.C.K., ed. Marcadores moleculares em plantas. Porto Alegre: UFRS, 1998. p.91-97.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, v.12, p.13-15, 1987.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2 ed. Curitiba: Biosystems, 1996. 220p.
- NELSON, J.C. ITMI Wheat mapping workshop- Laboratory manual. Cornell University, 1993.



Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Trav. Dr. Enéas Pinheiro s/n, Caixa Postal 48
Fax (91) 276-9845, Fone: (91) 299-4544
CEP 66095-100, Belém, PA
www.cpatu.embrapa.br

1 1 1 4 2 5

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

