

**Curso de Biotecnologia
ACH5545 - Engenharia Genética
Atividade de Laboratório**

(22/08/2024)

Extração de Ácidos Nucleicos e proteínas

O DNA é uma molécula orgânica, contida no interior da célula. Células procarióticas e eucarióticas apresentam DNA genômico. Vários procedimentos podem ser utilizados para extrair e isolar o DNA genômico, que incluem duas etapas principais (i) a lise das células presentes na amostra (por exemplo, através de ultrassom ou Proteinase K na presença de EDTA – para sequestrar cátions divalentes e inibir atividade de DNase), e (ii) purificação do DNA por solubilização da membrana celular/nuclear e desnaturação de proteínas com um detergente (por exemplo SDS) e precipitação dos restos celulares, proteínas e outros componentes celulares. Finalmente o DNA será suspenso em água ou tampão.

Os seres vivos são constituídos por macromoléculas responsáveis por diversas funções vitais: ácidos nucleicos, lipídeos, carboidratos e proteínas. As proteínas são moléculas orgânicas, formadas por subunidades denominadas α -aminoácidos (20 aminoácidos naturais) que se ligam através de ligações peptídicas, entre o grupo amino de um aminoácido e o grupo carboxila de outro. As proteínas podem apresentar propriedades e atividades totalmente diferentes devido às diversas combinações e sequências dos aminoácidos presentes nas moléculas. Três etapas são importantes na obtenção de proteínas: rompimento celular, inativação ou remoção de interferentes e solubilização das proteínas.

1- Extração de DNA genômico de bactérias

(EasyPure Genomic DNA kit, Trans LifeSciences)

O procedimento é utilizado para extração de DNA genômico (gDNA) de diversas fontes biológicas.

Procedimento

Preparar banho maria ou banho seco a 55°C

1. Realizar uma cultura de bactéria, por exemplo *Escherichia coli* (*E. coli*) em 10 mL de meio LB líquido (10 g Peptona/ 5 g extrato levedura /5 g NaCl, por litro), incubar 18 h sob agitação 37°C.
2. Centrifugar a cultura (3-5mL; 10000 rpm/8 min, temperatura ambiente) e obtenha uma quantidade adequada de massa celular ~100 µl.
3. Suspenda a massa de bactéria em 100 µl de tampão LB2 + 20 uL de Proteinase K, misture por pipetagem até dissolver a massa de bactéria.
4. Incubar a 55°C/15 min.
5. Adicionar 500 uL de tampão BB2, misturar por inversão 5 segs, incubar a temperatura ambiente (TA) por 10 min.
6. Transferir o lisado a coluna, com seu correspondente tubo reservatório e centrifugar à 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o líquido do tubo reservatório.
7. Adicionar 500 uL de tampão CB2, centrifugar à 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o líquido do tubo reservatório.
8. Repetir a etapa anterior
9. Adicionar 500 uL de tampão WB2, centrifugar à 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o líquido do tubo reservatório.
10. Repetir a etapa anterior
11. Centrifugar a coluna, 10.000 rpm, TA por 1 minuto. Descartar o tubo reservatório e transferir a coluna a um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
12. Adicionar no cetno da coluna 50 uL de tampão de eluição ou água estéril (aquecidos a 65°C). Incubar a TA por 2 minutos. Centrifugar à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto, para eluição do DNA genômico, coletado no microtubo de centrífuga.
13. Conservar o gDNA isolado ~20°C.
14. Realizar a Eletroforeses e quantificar.

2- Extração de DNA plasmidial de bactérias em pequena escala: “Miniprep”

(Plasmid DNA Purification using the QIAprep Spin Miniprep Kit, www.qiagen.com)

Procedimento:

1. Realizar uma cultura de *E.coli*, contendo o plasmídeo, em 5 mL de meio LB com antibiótico, incubar por 12-18 h sob agitação à 37°C.
2. Posteriormente, colocar 1,5 mL da cultura em microtubo de 1,5 mL.
3. Centrifugar à 10.000 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos e remover o sobrenadante.
4. Acrescentar 1,5 mL da cultura nos respectivos tubos e repetir os passos 2 e 3.
5. Suspender o sedimento bacteriano em 250 µL da Solução P1.
6. Acrescentar 250 µL da Solução P2. Misturar por inversão, **NÃO VORTEXAR OS TUBOS**. Uma solução viscosa deverá ser formada imediatamente devido à lise das células.
7. Acrescentar 350 µL da Solução N3. Misturar por inversão, **NÃO VORTEXAR OS TUBOS**. Um precipitado branco deverá ser formado imediatamente. Este precipitado contém DNA genômico e restos celulares. O DNA plasmidial permanecerá em solução.
8. Centrifugar os tubos à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 10 minutos.
9. Remover 750 µL do sobrenadante cuidadosamente e transferi-lo para coluna QIAprep Spin, com tubo reservatório.
10. Centrifugar os tubos à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto, descartar o líquido do tubo reservatório.
11. Lavar a coluna QIAprep Spin, adicionando 0.75 mL de solução PE
12. Em seguida, centrifugar à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto.
13. Descartar o líquido do tubo reservatório, centrifugar à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto.
14. Transferir a coluna QIAprep Spin a tubo limpo, eluir o DNA por adição de 50 µL de solução EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) ou água.

15. Centrifugar os tubos à 10.000 rpm, temperatura ambiente, por 1 minuto, descartar a coluna QIAprep Spin, o DNA está em solução.

16. Realizar a Eletroforeses e quantificar.

3- Extração de proteínas de Levedura

Procedimento:

1. Realizar uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* em 5mL de meio YPD por 3 – 5 dias sob agitação à 30°C. Colocar 1,5 mL da cultura em microtubos de 1,5 mL;

2. Centrifugar a cultura (10000 rpm/8 min, temperatura ambiente) e obtenha uma quantidade adequada de massa celular ~200 µl.

3. Suspender o precipitado em 250 µl de tampão de extração;

4. Adicionar um volume equivalente a 100 µl de microesferas/pérolas de vidro (tamanho de 450 a 600 µm);

5. Agitar em vórtex por 20 min, em intervalos de 5 min, mantendo no gelo, velocidade máxima;

6. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min, temperatura ambiente;

7. Separar o sobrenadante do material sedimentado.

8. Realizar eletroforese em gel de SDS-PAGE, utilizando 20 µL do sobrenadante obtido.

Tampão de Extração

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

50 mM NaCl

0,2% Triton X-100