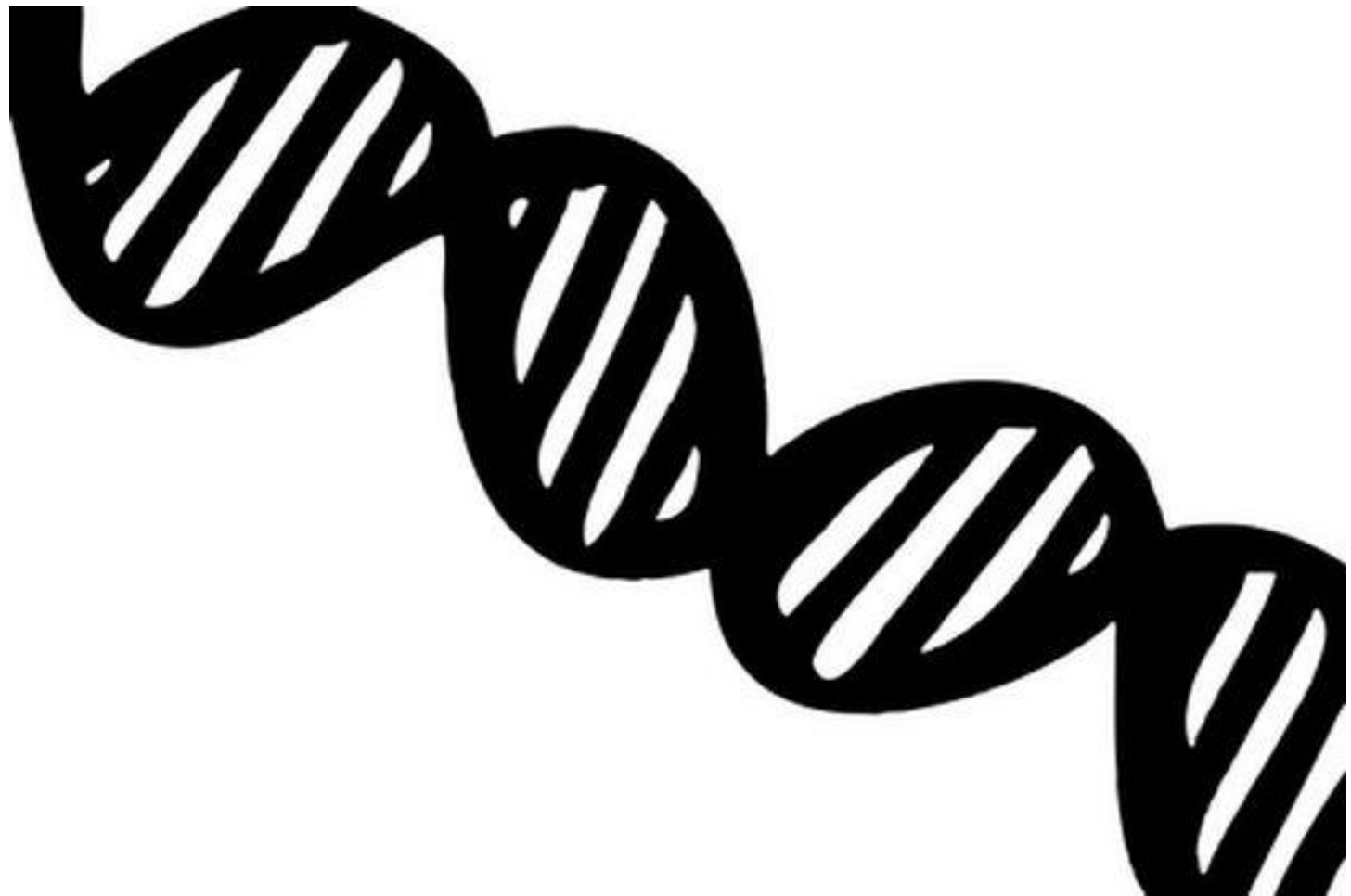


Extração de DNA



O que é desejável numa extração de DNA:

- Obter um ótimo rendimento de DNA
- Remover ou inibir a nucleases da célula
- Ter um DNA “limpo” (grau de pureza)

Métodos para isolamento de DNA

A separação do DNA dos demais componentes celulares pode ser dividido em 4 etapas:

1. Rompimento da parede celular
2. Lise da membrana
3. Remoção das proteínas and contaminantes
4. Recuperação do DNA

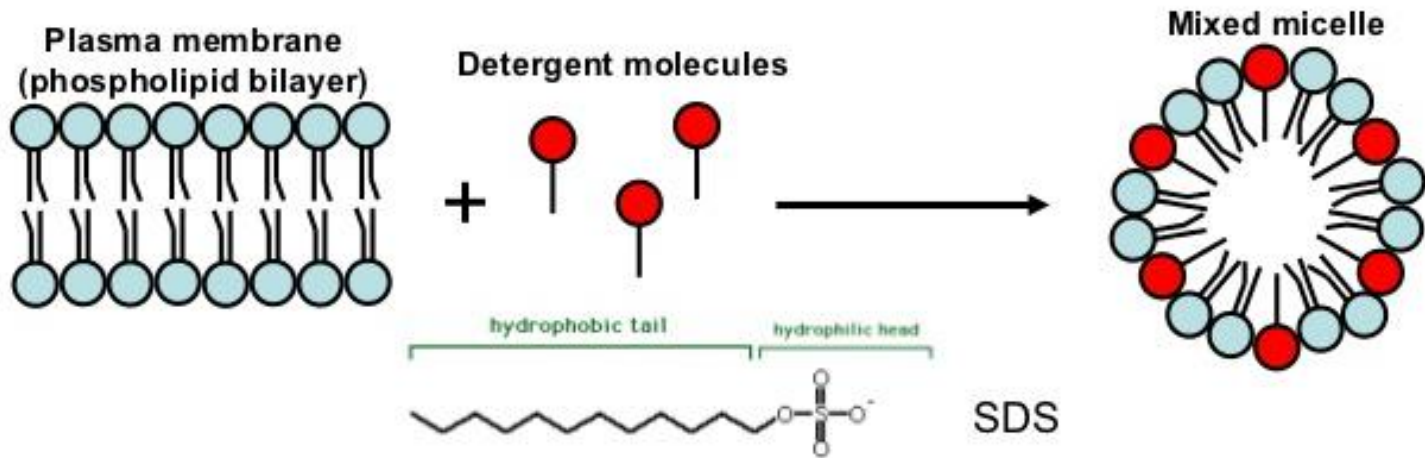
Em muitos métodos, as etapas 1 e 2 são combinadas

Rompimento/Lise celular

- Pode ser conseguida por métodos físicos (por ex. ultrasson, variação de temperatura, etc) ou químicos (sais caotrópicos, enzimas e/ou detergentes num tampão de lise).

Métodos para lise da membrana

Use of Detergents to Lyse Cells:



Métodos *Salting-out*

Proteínas e outros contaminantes são **precipitados** partir do lisado celular usando altas concentrações de sais: p. ex.

- acetato de potássio ou de sódio (mais comum) ou
- acetato de amônio (reduz co-precipitação de oligossacarídeos e dNTPs).

Os precipitados são removidos por centrifugação e o DNA é recuperado por precipitação alcóolica.

Problemas:

- A remoção das proteínas e outros contaminantes pode ser ineficiente;
- O rendimento e a pureza do DNA são altamente variáveis usando este método.

Métodos de extração com solventes orgânicos

As células são lisadas usando um detergente e então misturadas com fenol-clorofórmio -álcool isoamílico.

- DNA é recuperado da fase aquosa, geralmente por precipitação alcóolica.
- Problemas:

Uso de compostos tóxicos e geração de lixo tóxico;

O DNA isolado pode conter resíduos de fenol/clorofórmio, os quais podem inibir reações enzimáticas posteriores;



Métodos “Silica-based”

Baseados na adsorção seletiva dos ácidos nucléicos a uma cluna de sílica na presença de altas concentrações de sais caotrópicos.

- Somente o DNA e adsorvido e os demais contaminantes permanecem e solução e são “lavados” da coluna;
- O DNA é eluído da coluna de sílica usando um tampão com baixa concentração de sal ou água;
- Não é necessária a precipitação com álcool.

