

## 42. Extração de DNA (DNAzol Reagent)

### 1. Lise e homogeneização de células e tecidos:

- Células em monocamadas: adicionar 0,75 - 1,0mL de DNAZOL Reagent para cada 10cm<sup>2</sup> de área da garrafa de cultivo. Lisar as células por agitação da garrafa de cultivo e pipetar gentilmente o lisado em um tubo de ensaio.
- Pellet ou suspensão de células: Adicione 1mL de DNAZOL Reagent para cada 1 a  $3 \times 10^7$  células, tanto no pellet como em suspensão (volume < 100μL). Lisar as células pipetando gentilmente.
- Tecidos de mamíferos: adicionar 1mL de DNAZOL Reagent para cada 25-50 mg de tecido previamente picotados com lâmina de bisturi (deve-se obter uma massa homogênea de tecido sem a presença de fragmentos maiores). Lisar as células pipetando várias vezes. Agitar no vórtex por 1 minuto.

### 2. Centrifugação:

- Sedimentar o homogeneizado através de centrifugação por 10 minutos a 11.000 rpm a temperatura ambiente ou a 4°C. Este passo remove fragmentos de tecido insolúveis, RNA e excesso de polissacarídeos do lisado/homogeneizado.
- Transferir o sobrenadante para um novo tubo.

### 3. Precipitação de DNA:

- Adicionar no mínimo 500μL de etanol 100% para cada 1 mL de DNAZOL Reagent utilizado na lise.
- Misture através da inversão dos tubos (5x) e incube à -20°C por no mínimo 1 hora.
- Centrifugue a 7.000 rpm por 8 minutos a temperatura ambiente.

### 4. Lavagem do DNA:

- Lavar o DNA precipitado 2 vezes com 1,0 mL de etanol 75%. A cada lavagem suspender o DNA em etanol invertendo o tubo 3-6x.

- Centrifugar 11.000rpm por 3 min e remover o etanol com cuidado.

#### **5. Solubilização do DNA:**

- Secar o DNA incubando o tubo aberto por 1 minuto a temperatura ambiente;
- Dissolver o DNA em 200 - 300µL de TE ou NaOH 8mM, ressuspender pipetando cuidadosamente;
- As preparações de DNA isoladas a partir de tecidos como: fígado, músculos e nervo trigêmeo podem conter alguns materiais insolúveis (a maioria polissacarídeos). Remova os materiais insolúveis por centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos.
- Após a solubilização do DNA em NaOH 8 mM, ajuste a solução de DNA ao pH desejado através da adição de HEPES. Use as seguintes quantidades de HEPES 100mM ou 1 M por mL de NaOH 8mM.
- O DNA é estável em NaOH por vários meses a 4°C, quando for estocado por períodos maiores do que 1 ano deve ser armazenado a -20°C,

### 43. Extração de DNA com Fenol/Clorofórmio

**Processo Inicial das amostras-** quando a amostra for seguimento intestinal ou fezes: marcar (1g) com areia estéril, add 9ml de MEM 2x antibiótico, centrifugar a 3500 rpm por 10 min a 4°C. Utilizar 250uL do sobrenadante para a extração. Começar direto no passo 2, o restante das amostras devem seguir normalmente o protocolo.

1. Macerar de 50 a 150 mg do tecido com uma lâmina de bisturi sobre superfície

DNA free (placa de petri ou lâmina de transparência).

**Digestão com proteinase K-** em extrações de sobrenadantes de macerados, sobrenadante de células e soluções líquidas (Item 1) o tempo de incubação com a proteinase K deve ser de 15 a 30 min, no máximo. Para os demais tecidos, o material deve ficar até 1h e 30 min em contato com a proteinase, mas a digestão do tecido deve ser avaliada a cada 15 min. Quando o tecido estiver totalmente digerido a incubação deve ser interrompida, dando sequência aos passos seguintes da extração.

2. Resuspender o tecido macerado com 10% (Peso/volume) de TE buffer.

Homogeneizar com pipetador. Ex.: Para cada 100mg de tecido usar 1000 µL de TE.

3. Adicionar 20µg/mL de RnaseA e 1% de SDS. Para 100mg de tecido, isto é, 1mL de TE buffer, adicione 2µL de RnaseA à 10mg/mL e 100µL de SDS à 10%.

4. Incubar a 56°C em banho-maria por 15-30 minutos.

5. Adicionar 1mg/mL de proteinase K. Incubar a 56°C por mais 1 hora ou até a digestão total do tecido. Agitar manualmente a amostra a cada 10-20 minuto. Para 100mg de tecido, utilizar 50µL de proteinase K à 20mg/ml. Para tecidos moles, como cérebro, pode adicionar 0,5mg/ml de proteinase K, ou seja, 25µL para cada 1ml de TE.

6. Adicionar fenol-clorofórmio (1:1) no mesmo volume da solução. Misturar por inversão e centrifugar a 9000 rpm por 10 minutos.

7. Coletar a fase aquosa superior, tendo o cuidado de não coletar a fase intermediária. Adicionar o mesmo volume de fenol-clorofórmio (1:1), misturando por inversão. Repetir este procedimento até limpar a fase intermediária (aproximadamente 3x).

8. Coletar a fase aquosa superior, medir o volume coletado e adicionar 2,2x o volume de etanol 100% e 10% do volume de acetato de sódio 3M.

9. Homogeneizar por inversão e deixar precipitando durante a noite à -20°C ou à -70°C por no mínimo 1h.

10. Centrifugar a 9000 rpm por 30 minutos;

11. Remover o sobrenadante (por inversão), cuidando para preservar o *pellet* de DNA.  
Lavar *opellet* com 0,5ml de etanol 75%, centrifugar a 9000 rpm por 5-10 minutos.
12. Remover o sobrenadante, retirando a última gota após rápido *spen*, e deixe o pellet secar por alguns minutos.
13. Ressuspender em TE aquecido (50-100µl).
14. Mensurar e estocar o DNA.

**Reagentes e Soluções:**

1. TE Buffer

Reagentes	Quantidades
TRIS 1M pH 8,3	10mL
EDTA 0,5M pH 8,0	2mL
Água ultrapura qsp	1 litro

2. RnaseA (10mg/mL)

3. SDS 10%

4. Acetato de sódio 3M

5. Proteinase K (20mg/mL)

Reagentes	Quantidades
Proteinase K	100mg
Solução de diluição	5mL

\* A solução de diluição deve conter 50mM Tris-HCl (pH8,0), 3mM de CaCl<sub>2</sub> e 50% de glicerol.

\*Após diluir a proteinase K, filtrar com o auxílio de um filtro de 0,2µm. Aliquotar e congelar à -20°C.