

	<p>Governo do Estado do Rio Grande do Norte Secretaria de Estado da Educação, da Cultura e dos Desportos - SECD UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN Faculdade de Ciências da Saúde - FACS Disciplina: Citologia e Organização Biomolecular 12 Créditos – 180h e-mail: wogel.uern@gmail.com fone: (84) 3318-3708 Mossoró –RN</p>	
<p>ROTEIRO PARA AULA PRÁTICA Aula 3: Extração e Quantificação de DNA</p>		

I. INTRODUÇÃO

O procedimento básico de qualquer protocolo de extração de DNA envolve lise celular, com libertação de todo o material intracelular, e purificação do DNA. O processo de rompimento das células é a parte do protocolo que mais varia se compararmos os diferentes processos de extração de diferentes materiais biológicos: bactéria, levedura, células vegetais, células animais, etc. Com a lise celular são libertados para a solução todos os compostos intracelulares: proteínas, lípidos, polissacarídeos, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular.

A extração e quantificação do DNA é bastante utilizada na prática clínica para fins diagnósticos, também é utilizado na medicina Florence e legal. No meio da pesquisa científica com doenças genéticas, virais, bacterianas ou até mesmo parasitárias é uma prática exercida como doutrina, pois a extração do material genético é a base para o diagnóstico comparativo e epidemiológico.

II. EXTRAÇÃO DO DNA:

1. Adicionar ao sangue (com EDTA) previamente homogeneizado 17,5 mL de tampão de lise de células vermelhas em tubo do tipo falcon de 50 mL;
2. Incubar em gelo durante 30 minutos;
3. Centrifugar a 3.200 rpm à 10⁰C durante 15 minutos;
4. Desprezar o sobrenadante em recipiente contendo hipoclorito de sódio, permanecendo apenas o pellet de células brancas no fundo do tubo;
5. Adicionar 2,5 mL do tampão de lise para células brancas;
6. Dissolver o pellet com pipeta estéril até se tornar uniforme;
7. Adicionar 2,5 mL de acetato de amônio 5,0 M;
8. Centrifugar a 3.200 rpm à 25⁰C por 30 minutos;
9. Transferir o sobrenadante para tubos do tipo falcon de 50 mL;
10. Adicionar 4 mL de isopropanol (propanol) para precipitação do DNA;

	<p>Governo do Estado do Rio Grande do Norte Secretaria de Estado da Educação, da Cultura e dos Desportos - SECD UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN Faculdade de Ciências da Saúde - FACS Disciplina: Citologia e Organização Biomolecular 12 Créditos – 180h e-mail: wogel.uern@gmail.com fone: (84) 3318-3708 Mossoró –RN</p>	
<p>ROTEIRO PARA AULA PRÁTICA Aula 3: Extração e Quantificação de DNA</p>		

11. Homogeneizar levemente e observar a precipitação do DNA;
12. Pescar, sem aspirar, o DNA com uma ponteira estéril de 200 μ L;
13. Transferir para microtubo do tipo eppendorf estéril previamente identificado;
14. Lavar com 200 μ L de etanol 70%;
15. Desprezar o excesso de etanol;
16. Deixar secar no fluxo durante no mínimo 30 minutos com o microtubo aberto;
17. Ressuspender em 500 μ L de água milli-Q autoclavada;
18. Fechar os microtubos e deixa-los secar durante 30 minutos no fluxo laminar;
19. Homogeneizar o DNA com ponteiras estéreis de 200 μ L, com cuidado para não haver aspiração;
20. Armazenar no congelador ou no freezer.

III. Quantificação de DNA em O.D a 260nm:

1. Diluir a amostra de DNA a 1:100 (10 μ L de DNA estoque + 990 μ L de água milli-Q autoclavada);
2. Ajustar o espectrofotômetro para 260 nm;
3. Zerar a absorbância com o branco (água milli-Q autoclavada);
4. Calcular a diluição para 20 ng/ μ L com o auxílio da tabela no Excel.

IV. Questão Clínica Aplicada:

A Leishmaniose Visceral, também conhecida popularmente como calazar ou barriga d'água, trata-se da infecção por protozoário do complexo *Leishmania donovani*. A etiologia da doença compreende, conforme dito, protozoários do gênero *Leishmania*, parasita intracelular obrigatório do sistema fagocítico mononuclear, também chamado retículo-endotelial. No Biomol é realizada pesquisa com base no diagnóstico de indivíduos detectados com *Leishmania*, o processo final do diagnóstico é feito na leitura da eletroforese, técnica que ler a concentração de pares de bases de DNA, no caso o específico para o DNA da *Leishmania*. Um médico cubano veio fazer uma pesquisa e você foi convidado para o ajudar e ver como funcionava depois que todos estavam com os EPI's submeteram o soro do sangue de alguns pacientes para realizar a ampliação e eletroforese do DNA. Você que já é conhecedor sobre a prática de Extração de DNA percebeu que o Cubano não havia feito a extração do DNA simplesmente ele teria submetido o soro purificado na eletroforese, dessa forma você se indaga pra si mesmo – “ao submeter o soro será possível a leitura pela eletroforese? O resultado será válido, pois afinal de contas tem DNA do patógeno do soro!?” dessa forma, justifique seus próprios pensamentos e ajude ao cubano nessa prática.