

Avaliação da integridade e qualidade do DNA após extração por *Salting out* e Proteínase K/Fenol-clorofórmio



paz no plural



Betânia de Souza Ponce^{1,2}, Cláudia Maria Dornelles da Silva²



¹Curso de Biomedicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

²Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

Introdução

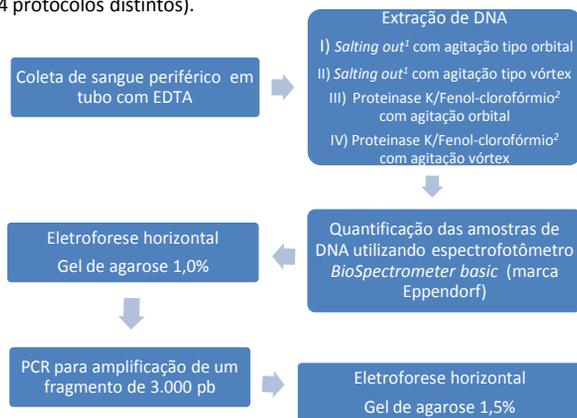
A etapa de extração de DNA é de suma importância em análises de biologia molecular. A obtenção de DNA de boa qualidade tem impacto direto sobre os resultados de técnicas como: reação em cadeia da polimerase (PCR), *Southern blotting*, sequenciamento e *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Nos procedimentos de extração de DNA, duas etapas são críticas: a lise das células para liberação do DNA do núcleo e a remoção de proteínas, restos celulares e de organelas. O DNA, apesar de possuir certa estabilidade, pode, ao longo do procedimento de extração, sofrer quebras cromossômicas devido às agitações mecânicas e ao manuseio da amostra. Diferentes protocolos tem sido descritos com o objetivo de minimizar esses danos e aumentar a pureza do DNA, visando o sucesso das análises. Dentre esses protocolos estão extrações conhecidas como: *Salting out*¹ e Proteínase K/Fenol-clorofórmio².

Objetivo

Comparar a integridade e a qualidade de DNAs obtidos através da aplicação de quatro protocolos de extração de DNA, visando a utilização da técnica de PCR.

Metodologia

Seis amostras de sangue total foram colhidas e separadas cada uma em quatro alíquotas de 1 ml. As técnicas de *Salting out* e Proteínase K/Fenol-clorofórmio foram utilizadas aplicando-se etapas com agitação leve (orbital) das amostras ou agitação vigorosa (vórtex) (4 protocolos distintos).



Resultados

Tabela 1. Comparação entre concentrações e graus de pureza da molécula de DNA após aplicação de quatro protocolos de extração (médias dos resultados obtidos).

Parâmetros/Técnicas	I	II	III	IV	Referências
Concentração DNA (ng/μl)	332,03	282,02	165,63	165,3	----
Absorbância 260/280	1,77	1,86	1,87	1,85	1,8 – 2,0
Absorbância 260/230	1,72	2,44	2,22	2,38	2,0 – 2,2

Razão absorbância 260/280: abaixo de 1,8 indica presença de proteínas.

Razão absorbância 260/230: abaixo de 2,0 indica presença de fenol e outros contaminantes.

Referências

- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215
- Sambrook J, Green MR. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2014.

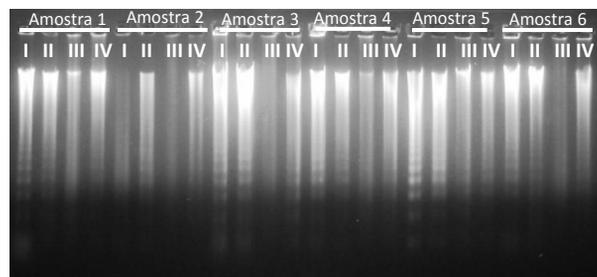


Figura 1. Análise da integridade do DNA genômico após as extrações (eletroforese horizontal em gel de agarose 1%). Em cada canaleta foi aplicado 3 μL de DNA extraído pelas técnicas: (I) *Salting out* com agitação orbital, (II) *Salting out* com vortex, (III) Proteínase K/Fenol-clorofórmio com agitação orbital e (IV) Proteínase K/Fenol-clorofórmio com vórtex. As técnicas I, II e IV apresentaram uma maior quantidade de fragmentos pequenos do que a III, mostrando um maior número de quebras do DNA genômico.

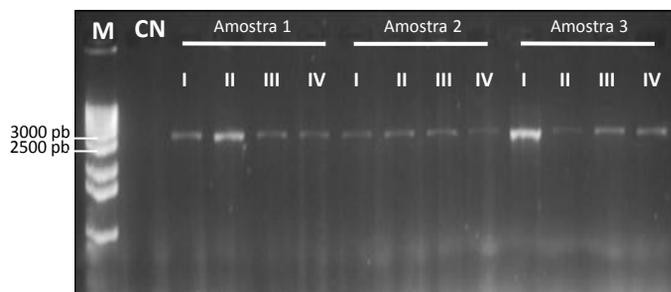


Figura 2. Análise da eficiência da amplificação dos DNAs através da técnica de PCR (eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%). Em cada canaleta foi aplicado 5 μL do produto do PCR referente as seis amostras submetidas as técnicas: (I) *Salting out* com agitação orbital, (II) *Salting out* com vortex, (III) Proteínase K/Fenol-clorofórmio com agitação orbital e (IV) Proteínase K/Fenol-clorofórmio com vórtex. M: Marcador de peso molecular: 1 Kb. CN: controle negativo.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos através da quantificação das amostras (tabela 1), pode-se concluir que os protocolos I e II geraram maior concentração de DNA do que os protocolos III e IV. Já em relação a pureza do DNA, nota-se que os protocolos II, III e IV geraram os melhores graus de pureza. Em relação a integridade do DNA obtido (figura 1), é possível observar que o protocolo III apresentou DNAs com menor número de quebras genômicas em relação aos demais. Na figura 2 é possível observar a amplificação do fragmento de 3000 pb em todos os protocolos, demonstrando a boa qualidade das amostras. Por fim, conclui-se que as duas versões da técnica de extração por *Salting out* (I e II) podem ser utilizadas em técnicas de biologia molecular, cujos resultados dependem da presença de uma boa concentração de DNA ou cujas quebras genômicas não interferiram na interpretação da análise. Por outro lado, a extração com Proteínase K/Fenol-clorofórmio com agitação orbital se mostrou mais adequada por preservar mais a integridade do DNA e, nesse caso, pode indicada para uso em técnicas, cujas análises visem a detecção de mutações do tipo grandes deleções, a exemplo da técnica de MLPA.

Agências de fomento

FDRH/FEPPS, CNPq, CAPES, FAPERGS.