

Protocolo de extração de DNA de tecido vegetal:

(Doyle & Doyle, 1987)

PROCEDIMENTOS

1. Preparo do Material

- » Primeiro verifique se todas as soluções estão preparadas;
- » Ligue o banho-maria a 65°C;
- » Prepare três conjuntos idênticos de tubos devidamente numerados (2 conjuntos de tubos de 2ml e 1 conjunto de 1,5ml);
- » Anote na ata de laboratório a correspondência entre os números nos tubos e a identificação das amostras;

***Adicione 2-mercapto-etanol à quantidade necessária de tampão, na proporção de 2µl de 2-mercapto-etanol para cada ml de tampão de extração. Mantenha tampão de extração quecido em banho-maria a 65°C;**

2. Pese 100 a 200mg de tecido fresco e 20 a 50mg para tecido seco, cada amostra diretamente dentro do tubo.

UTILIZAÇÃO DAS BEADS:

- **Beads menores de zircônio**, colocar até 12 esferas em cada tubo *Eppendorf* de uma forma que fiquem espalhadas no meio do tecido;
 - Adicionar no tubo, já com as folhas e as beads, 700µl tampão de extração mais 2-mercaptoetanol e macerar o tecido utilizando o macerador Mini Beadbeater-96, por 2 minutos. OBS: este é um tempo estimado, depende do tipo de tecido a ser macerado.

- **Beads maiores de metal ou porcelana**, colocar 2 beads em cada tubo *Eppendorf*, uma em baixo (de forma esférica) do tecido e a outra em cima (de forma poliédrica), como se fosse um sanduiche,
 - Adicionar no tubo, já com as folhas e as beads, 700µl tampão de extração mais 2-mercaptoetanol e macerar o tecido utilizando o macerador Mini Beadbeater-96, por 20 a 25 segundos. OBS: este é um tempo estimado, então depende do tipo de tecido a ser macerado.

3. Agite os tubos no vórtex até que fique bem homogeneizado. Incube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 65°C por um mínimo de 30 minutos

- » Durante a incubação, agite os tubos a cada 10 minutos para homogeneizar;

- » Retire os tubos do banho-maria;
- » Deixe-os chegar a temperatura ambiente;

4. Em capela de exaustão, faça a primeira extração com solvente orgânico adicionando 600µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1)

- » Agite os tubos no vórtex e depois invertendo-os durante 5 minutos (no mínimo 20 vezes), ou até fazer uma emulsão homogênea;

5. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (14000 rpm) durante 5 minutos.

6. Retire cuidadosamente os tubos da centrífuga, evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas

- » Pipete a fase superior (aquosa) para um novo tubo;
- » Para acelerar esta operação regule a pipeta para 180 e retire 3 alíquotas (~540) fixas. Mesmo que isso implique em deixar algum volume para trás, este procedimento ajuda a evitar possíveis contaminações com a fase orgânica inferior;

7. À fase aquosa no novo tubo adicione 1/10 do volume (~50) de uma solução 10% CTAB, 1,4 M NaCl (solução bastante viscosa)

- » Agite no vórtex e misture bem durante 5 minutos até homogeneizar a solução;

8. Repita a extração com 600µl de CIA (passos 7 e 8);

- » Em capela de exaustão, faça a primeira extração com solvente orgânico adicionando 600µl de CIA (clorofórmio-álcool isoamílico) 24:1
- » Agite os tubos no vórtex e depois invertendo-os durante 5 minutos (no mínimo 20 vezes) ou até fazer uma emulsão homogênea;

9. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (12000rpm) durante 5 minutos;

10. Retire novamente a fase aquosa superior e transfira-a, cuidadosamente, para um novo tubo;

11. Adicione 2/3 do volume da solução aquosa (~ 400µl) de isopropanol gelado (-20°C);

- » Misture calmamente para precipitar os ácidos nucleicos;
- » Leve os tubos ao freezer -20°C por 1 a 2 horas (isso vai depender do tipo de tecido a ser extraído);

*** Este é um ponto adequado para parar o procedimento de extração se não for possível continuar no mesmo dia.**

PRECIPITAÇÃO

12. Centrifugue os tubos a 7500rpm em microcentrífuga durante 5 minutos, para formar um pellet.

*** Se o pellet não for visível coloque o tubo a -20° por 30 minutos ou mais, e centrifugue novamente**

*** Se o pellet obtido se apresentar muito grande, viscoso e/ou escuro é sinal de contaminantes – Deve-se fazer uma LAVAGEM COM NaCl – VER NAS OBSERVAÇÕES;**

13. Com cuidado derrame o máximo possível de sobrenadante **sem perder o pellet**

14. Lave o pellet 2 vezes em 1mL de etanol 70%

» Deixe o pellet imerso por 10 minutos cada vez;

» Descarte o etanol;

15. Lave o pellet 1 vez em 1mL de etanol 95% (ou absoluto) durante 3 minutos

» Retire o máximo possível do etanol, deixando secar (utilizar Concentrador Plus);

16. Ressuspenda o pellet em 50µl ou 100µl de TE com RNase

» No banho maria por 37°C por 2 horas;

» Ou deixar em *over-night* na geladeira;

PREPARO DAS SOLUÇÕES

⇒ Tampão de extração CTAB 2%

- Para preparar 100ml

Reagentes	Para 100ml	[] final
CTAB	2,0 g	2,0%
NaCL	8,12 g	1,4 M
EDTA (0,5M)	4ml	20mM
Tris-Cl pH 8,0 (1M)	10ml	100mM
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	1g	1,0%
Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP)	3g	3,0%
Água destilada ¹ q.s.p.	100ml	
² 2-mercaptoetanol	2µl/ml de Tampão	0,2%

¹- q.s.p – quantidade suficiente para completar a solução.

²- 2 - mercaptoetanol só adicionado na hora da extração.

(executar esta operação dentro da capela, pois possui um odor bastante desagradável é bastante tóxico).

⇒ CTAB 10%

- Para preparar 50ml

Reagentes	Quantidades	[] final
CTAB	5,0 g	10%
NaCL	4.1 g	1,4 M

⇒ Tampão Tris-CL Ph 8,0

- Para preparar 200ml

Reagentes	Quantidades	[] final
Tris	24,228g	1M

Colocar um pouco de água para dissolver o Tris (se preciso for, utilizar o agitador e aquecimento). Em seguida, medir o Ph e colocar HCl (fumegante) até atingir o Ph 8,0. Adicionar água q.s.p. 200ml.

- Autoclavar

⇒ **Tampão EDTA 0,5M**

- **Para preparar 500ml**

Reagentes	Quantidades	[] final
EDTA	93,06g	0,5M
Água MilliQ q.s.p.	500mL	

Colocar um pouco de água milliQ para dissolver o EDTA (utilizar o agitador). Em seguida, adicionar *hidróxido de sódio* (NaOH), medir o pH até atingir o pH 8,0.

- **Autoclavar**

⇒ **Tampão TE (pH 8,0)**

- **Para preparar 1000ml**

Reagentes	Quantidades	[] final
EDTA pH 8,0 (0,5M)	2ml	1mM
Tris-Cl pH 8,0 (1M)	10ml	10mM
Água MilliQ	1000ml	

- **Autoclavar**

⇒ **Preparo de TE com RNase:**

Para preparar 2ml

1µL de RNase (20mg/mL) para 1999 µL de TE;

OBSERVAÇÕES:

LAVAGEM COM NaCl

- Adicione ao pellet 500µl de NaCl 1M
- ◇ Dissolva o pellet ao máximo, aquecendo o tubo em banho maria a 65°C por 15 minutos (o DNA estará em solução);
- ◇ Incubar o tubo a 4°C por 30 minutos a 1 hora;
- Centrifugue os tubos a 15000 rpm por 10 minutos;
- Retire o sobrenadante para um novo tubo e promova a lavagem e precipitação do DNA a partir do item 12 deste protocolo (descrito anteriormente).

LAVAGEM DAS BEADS

Quando for retirar o sobrenadante, reserve um recipiente para o descarte dos tubos eppendorfs contendo as beads e o resto do material macerado. Com ajuda de uma ponteira retire todo o material com as beads, se houver conteúdo líquido descartar em um recipiente próprio, para não ser jogado o material contaminante na pia.

Lavar as beads com água normal até sair todo o material, pois as beads são pesadas e vão ficando no fundo do recipiente. Descartar o restante do material nos recipientes próprio para descarte. Depois de separar todas as beads, enxaguá-las com água destilada, colocar no microondas com água destilada por 7 minutos, escorrer toda a água e colocar para autoclavar em água destilada. Após escorrer, secar na estufa e guardá-las.