

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 03
		Versão: 04
		Página 1

EXTRAÇÃO DE DNA – PRECIPITAÇÃO SALINA (SALAZAR ET AL., 1998)

1. Obter sangue periférico total colhido com EDTA.
2. Transferir 1 mL de sangue para um microtubo de 1,5 mL estéril.
3. Centrifugar a 5.000 r.p.m. por 5 minutos a temperatura ambiente sem eliminar a camada de leucócitos (clara).
4. Adicionar ao sedimento 900 µL do Tampão Tris1-1x contendo TRITON X-100 a 2,75 % (misturar 1 volume de Tampão Tris1- 10x + 9 volumes de TRITON X-100 a 2,75%).
5. Misturar por inversão várias vezes.
6. Centrifugar a 5.000 r.p.m. a TA, por 5 minutos.
7. Descartar o sobrenadante por inversão e adicionar ao sedimento 1 mL de Tampão Tris 1- 1x e, em seguida, centrifugar a 5.000 r.p.m. a TA, por 5 minutos.
8. Repetir este procedimento por cerca de três vezes, ou até que o sedimento, contendo os leucócitos, esteja branco (isento de hemoglobina).
9. Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento cuidadosamente com 200 µL de Tampão Tris2 –1x e homogenizar bem a suspensão
10. Adicionar 20 µL de SDS 10%. Misturar várias vezes, toda a suspensão com uma pipeta automática com ponteira estéril e de preferência com filtro. Incubar a 56°C por 15 minutos.
11. Adicionar 100 µL de NaCl 5 M e homogenizar bem. Centrifugar a 12.000 r.p.m. por 5 minutos a TA.
12. Transferir o sobrenadante para outro microtubo estéril.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 03
		Versão: 04
		Página 2

13. Adicionar ao sobrenadante 2 volumes de etanol absoluto gelado (aproximadamente 1,0 mL) e homogeneizar por inversão para precipitar o DNA.
14. Se necessário, deixar o tubo cerca de 30 minutos no congelador para auxiliar a precipitação.
15. Centrifugar a 12.000 r.p.m. por 5 minutos a TA. Adicionar ao sedimento 1mL de etanol 70 % gelado e centrifugar novamente a 12.000 r.p.m. por 5 minutos a TA.
16. Remover o etanol cuidadosamente, tomando o cuidado para não ressuspender o precipitado (DNA).
17. Repetir este procedimento por cerca de três vezes.
18. Deixar secando no speed vácuo por 5 minutos (ou com o auxílio do secador).
19. Ressuspender o DNA em 100µL de Tampão TE (pH 8,0).
20. Incubar a 56 °C por 15 minutos para hidratar o DNA.
21. Armazenar a solução de DNA a 4°C.

Preparo das soluções:

Tris 1 (TM1-10x) para 500 mL

Tris – HCl (pH=8,0) 1M

Pesar 60,55 g de Tris base

Pipetar 21 mL de HCl

Completar o volume para 500 mL e ajustar pH para 8,0

KCl 1M para 200 mL

Pesar 14,92 g de KCl

Completar o volume para 200 mL de água Milli-Q

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 03
		Versão: 04
		Página 3

Autoclavar a solução a 120°C por 20 minutos

MgCl₂ 1M para 200 mL

Pesar 40,66 g de MgCl₂

Completar o volume para 200 mL de água Milli-Q

Autoclavar a solução a 120°C por 20 minutos

EDTA 0,5 M pH 8,0 para 200 mL

Pesar 3,72 g de EDTA

Completar o volume para 200 mL de água Milli-Q

Autoclavar a solução a 120°C por 20 minutos

Medir o pH e acertar para 8,0

Tris 2 (TM2-1x) para 500 mL

Os reagentes da TM2-1x são os mesmos da TM1 salvo que, o TM2 possui um reagente a mais: o NaCl

NaCl 0,85 %

Pesar 0,85 g de NaCl

Completar o volume para 100 mL com água Milli-Q

Autoclavar a solução a 120°C por 20 minutos

Solução Triton X-100 (2,75 %)

Pipetar 2,75mL de Triton X-100

Completar o volume para 100 mL com água Milli-Q

Esterilizar esta solução através de filtração.

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	

	MANUAL – BIOLOGIA MOLECULAR	
Data: 01/07/2018 Próxima revisão: 01/07/2019	LABORATÓRIO DE METABOLISMO E LÍPIDES	Nº: 03
		Versão: 04
		Página 4

Preparo da solução estoque (mae)

Tris 1-10x (Tris-HCl a 50 mM, pH 8,0; KCl a 50 mM; MgCl₂ a 50 mM e EDTA a mM, pH 8,0)

Pipetar:

50 mL de Tris-HCl 1M

50 mL de KCl 1M

50 mL de MgCl₂ 1M

20 mL de EDTA 0,5M

Tris 2-1x (tris-HCl a 5 mM, pH 8,0; KCl a 5 mM; MgCl₂ a 5 mM e EDTA a 1 mM, pH 8,0 e NaCl a 0,2 mM)

Pipetar:

5 mL de tris-HCl 1 M

5mL de KCl 1 M

5 mL de MgCl₂ 1 M

2 mL de EDTA 0,5 M

40 mL de NaCl 5,0 M

Elaborado por: Priscila Oliveira de Carvalho	Aprovado por: Prof. Dr. Raul Cavalcante Maranhão
Revisado por: Carolina Graziani Vital	