

Comparação de diferentes detergentes utilizando a técnica de *salting out* para extração de DNA humano a partir de amostras sanguíneas

Comparison of different detergents in the technique of salting out for extracting DNA from human blood samples

Andressa Dametto¹; Claudete Rempel²; Júlia Pasqualini Genro³

¹ Bióloga, Assistente Acadêmica – Univates. Lajeado, RS – Brasil.

² Bióloga Doutora em Ecologia, Coordenadora do curso de Ciências Biológicas e Docente do Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Desenvolvimento – Univates. Lajeado, RS – Brasil.

³ Bióloga Doutora em Genética, Docente – Univates e na UFCSPA. Porto Alegre, RS – Brasil.

Endereço para correspondência

Júlia Pasqualini Genro
R. Sarmento Leite, 245, sala 403
90050-170 – Porto Alegre – RS [Brasil]
juliagenro@hotmail.com

Resumo

Introdução: A extração de DNA genômico em humanos é o primeiro passo para estudos de genética molecular. **Objetivo:** Avaliar o sucesso da extração de DNA genômico baseado na técnica de *salting out* a partir de amostras sanguíneas, comparando diferentes reagentes de lise de membranas. **Métodos:** Foram testados três reagentes caseiros e o reagente Nonidet P-40, em diferentes concentrações. Avaliaram-se a concentração do DNA obtido e a pureza das amostras por meio da espectrofotometria e a aplicabilidade na técnica de PCR. **Resultados:** Houve grande quantidade de DNA extraído utilizando Nonidet P-40 e sabão em pó. Quanto à qualidade do DNA, o Nonidet P-40 resultou em um DNA com maior pureza. Na PCR, apenas o DNA extraído com Nonidet P-40 apresentou amplificação satisfatória. **Conclusão:** O Nonidet P-40 parece ser o reagente mais indicado para uso em técnicas moleculares e o sabão em pó pode ser adequado para práticas em aulas de biologia molecular.

Descritores: DNA; Membrana celular; Sangue.

Abstract

Introduction: Extraction of genomic DNA in humans is the first step for molecular genetic studies. **Objective:** To evaluate the success of genomic DNA extraction based on the technique of salting out from blood samples, comparing different membrane lysis reagents. **Methods:** Reagent Nonidet P-40 and three homemade reagents were tested in different concentrations. We evaluated the concentration and purity of the DNA samples by spectrophotometry and its applicability in PCR techniques. **Results:** There was a large amount of DNA extracted using Nonidet P-40 and soap powder. As to the quality of the DNA, Nonidet P-40 yielded higher purity samples. After PCR, only the DNA extracted with Nonidet P-40 showed satisfactory amplification. **Conclusion:** Nonidet P-40 seems to be the most suitable reagent for use in molecular techniques, whereas soap powder may be suitable in molecular biology classroom settings.

Key words: Blood; DNA; Cell membrane.

Introdução

O ácido desoxirribonucleico (DNA) está presente no núcleo de todas as células dos organismos, com exceção das hemácias. Trata-se de uma molécula com dupla fita helicoidal, muito estável, na qual estão contidas informações únicas do indivíduo. Por ter essa singularidade, a utilização do DNA torna-se de suma importância nos estudos de genética molecular em humanos, tanto no que diz respeito a diagnóstico molecular quanto a pesquisas de variabilidade genética. A extração de DNA genômico em humanos é o primeiro passo para a grande maioria destas técnicas. Procedimentos como a digestão por endonucleases de restrição, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento genético, necessitam de DNA de qualidade para se obtenha bons resultados.

Há diferentes fontes biológicas que podem ser utilizadas para extrair DNA, entre elas estão: saliva, sangue, sêmen, raspado bucal, unhas, pelos, cabelos, células epiteliais, manchas ou restos de material biológico em objetos, ossos, dentes^{1,2,3}. O sangue é uma das fontes mais utilizadas por possuir grande quantidade de células, fornecer amostra fresca para a análise e ser de fácil obtenção e coleta.

Mesmo existindo diversos métodos que usam diferentes reagentes para a extração do ácido desoxirribonucleico, todos eles envolvem a lise celular para a liberação do material intracelular e purificação do DNA⁴. Uma das técnicas para essa extração usa fenol, clorofórmio e álcool isoamílico em seu procedimento^{5,6,7}. A ação do fenol e o clorofórmio é desnaturar as proteínas, ficando estas solubilizadas na fase fenólica, que com o auxílio do álcool isoamílico, se separa com maior eficiência da fase aquosa. A desvantagem do uso destes reagentes é quanto aos cuidados em seu manuseio, visto que são altamente tóxicos^{8,9}.

Miller, Dykes e Polesky¹⁰ descreveram uma técnica sem o uso de reagentes tóxicos, denominada de *salting out*, na qual as proteínas são desidratadas e precipitadas com o uso de uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl). A

solução dessa substância é eficiente para a extração de DNA e proporciona a substituição de reagentes tóxicos como fenol-clorofórmio¹¹. Para lisar as membranas, Miller, Dykes e Polesky¹⁰ utilizaram uma solução tampão de lise de núcleos, composta por tris hidrocloreto – Tris-HCl, cloreto de sódio – NaCl e edetato dissódico de cálcio – Na₂EDTA, após deixaram *overnight* a 37 °C com *sodium* dodecyl sulfate (SDS) 10% e uma solução de protease K. Em seus testes, utilizaram amostras de sangue total com anticoagulante (ACD ou EDTA). O DNA obtido a partir desta técnica rendeu quantidades semelhantes aos DNA obtidos pelo método com fenol-clorofórmio; e os índices de absorvâncias relação 260/280 foram satisfatórios (1,8-2,0), demonstrando boa desproteínização¹⁰. Esta técnica *salting out* também foi utilizada por Rivero et al.¹², demonstrando eficácia também em tecidos parafinados.

Lahiri e Nurnberger¹³ propuseram extração de DNA com a técnica *salting out*, agora a partir do uso do Nonidet P-40, em amostras de sangue total com anticoagulante. Não utilizaram os solventes fenol, clorofórmio e álcool isoamílico. O protocolo elimina também o processo de incubação prolongada por protease K, como descreve Miller, Dykes e Polesky¹⁰. Este procedimento gerou a extração de uma grande quantidade de DNA, em torno de 130-160 µg de 5 mL de sangue em um tempo reduzido. Além disso, produziu-se DNA de alta pureza, sendo adequado para a digestão com enzimas de restrição. Este método funciona igualmente bem, tanto com as amostras de sangue fresco quanto com as armazenadas a 4 °C, e também com aquelas armazenadas a -70 °C³.

Cardozo et al.¹⁴ avaliaram três protocolos de extração de DNA de sangue total e utilizaram as técnicas sobre o sangue coagulado. Eles testaram, com algumas modificações, dois *kits* comerciais (método de extração por EZ-DNA e *kit* de coluna NeoScience) e a técnica de Lahiri e Nurnberger¹³. Esses autores observaram que o método de *salting out* de Lahiri e Nurnberger obteve os melhores resultados para extração de sangue coagulado também, pois as concentrações de DNA foram

altas e possíveis de serem quantificadas, além de ser um procedimento rápido.

Na técnica de Lahiri e Nurnberger¹³, o reagente utilizado para lisar a membrana citoplasmática é o Nonidet P-40, que se mostrou bastante eficiente em vários estudos^{14, 15}. Porém, este reagente apresenta alguns inconvenientes: custo alto; só é vendido em grande quantidade; necessita importação levando a um prazo de entrega maior e, atualmente, só há uma marca que produz (Sigma), possuindo poucos fornecedores no Brasil.

Existem técnicas caseiras que funcionam bem para a extração de DNA genômico de outras fontes de DNA, como, por exemplo, de vegetais. Esta técnica, utilizada por Rodrigues et al.¹⁶, se baseia principalmente no uso de detergente de louça, sal e água quente, fornecendo grande quantidade de DNA no final da extração.

Drábek e Petrek¹⁷ desenvolveram uma técnica de extração de DNA utilizando reagentes caseiros, sal, açúcar e sabão em pó. O sabão em pó foi diluído em uma concentração de 20 mg/mL. Dessa vez, as amostras testadas foram sangue periférico de suíno. Eles observaram resultados com alto rendimento e pureza. O DNA não se degradou e foi possível sua utilização em *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com *primers* de sequências específicas. Estes autores concluíram que este procedimento de extração de DNA poderá servir de inspiração ao ensino de ciências nas escolas e pode ser útil em laboratórios de pequeno porte com orçamento limitado.

Nasiri et al.¹⁸ extraíram DNA genômico de amostras sanguíneas humanas usando sabão em pó de marcas diferentes, contendo formulações diferentes, para a lise de membrana citoplasmática e não utilizaram reagentes tóxicos. No procedimento utilizaram 330 µL de solução de sabão em pó, em diferentes concentrações de diluição: 20, 25, 30, 35 e 40 mg/mL. Concluíram que a concentração de 30 mg/mL de solução de sabão é a mais adequada; não houve diferenças significativas na qualidade e quantidade de DNA em relação às marcas¹⁸.

O objetivo deste trabalho é avaliar o sucesso da extração de DNA genômico, a partir de sangue humano, utilizando a técnica de *salting out* e comparar o Nonidet P-40 com sabões caseiros, no intuito de verificar o rendimento, pureza e possibilidade de uso deste DNA para técnicas moleculares como a PCR.

Materiais e métodos

Para os testes realizados neste trabalho, utilizou-se como base o protocolo de Lahiri e Nurnberger¹³. Adaptações foram propostas para se ajustar aos equipamentos e materiais existentes no Laboratório de Biologia Molecular do Centro Universitário Univates de Lajeado (RS), conforme descrito na Tabela 1. Foram testados quatro reagentes diferentes, cada um com quantidades ou concentrações diferentes para a extração de DNA: Nonidet P-40, nas dosagens de 50 µL, 100 µL e 250 µL; detergente líquido neutro (Ypê), nas dosagens de 250 µL, 500 µL e 1 mL; detergente líquido de glicerina (Limpol), nas dosagens de 250 µL, 500 µL e 1 mL e sabão em pó (Ypê), nas concentrações de 20, 30 e 40 mg/mL, na dosagem de 330 µL. Testaram-se duas amostras sanguíneas para cada concentração de cada reagente.

Para a realização do estudo, foram utilizadas 24 amostras de sangue de doadores voluntários participantes do grupo de pesquisa em Diabetes e Fitoterápicos, cujo projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Univates, sob o protocolo CEP 001/11. As amostras foram obtidas por punção venosa com o uso de seringa e agulha descartáveis por um profissional da saúde, que fez as coletas de acordo com as normas de saúde da vigilância sanitária. Foram coletados, em média, 3 mL de cada voluntário, os quais foram colocados em um tubo de ensaio com o anticoagulante EDTA, tampado e acondicionado em uma caixa de isopor refrigerada para transporte, devidamente identificado com dados do voluntário. As amostras de sangue foram guardadas em

Tabela 1: Descrição do protocolo utilizado para extração de DNA deste trabalho, adaptado de Lahiri e Nurnberg

Etapa	Procedimentos para a extração de DNA
1	Coletar sangue total em um tubo <i>vacutainer</i> contendo EDTA (100 µL EDTA 15%).
2	Transferir todo o conteúdo de sangue total para um tubo <i>falcon</i> de 15 mL. Adicionar volume igual de TKM1.
3	Adicionar quantidade e tipo de reagente a ser testado. Misturar bem por inversão várias vezes e passar no vórtex.
4	Centrifugar a 3000 RPM durante 10 minutos à temperatura ambiente.
5	Retirar o sobrenatante por inversão. Lavar o <i>pellet</i> com 5 mL de TKM1, agitar bem por inversão e com o vórtex até desmanchar ao máximo o <i>pellet</i> . Centrifugar novamente a 3000 RPM durante 10 minutos. Repetir esse passo aproximadamente três vezes, ou até que o <i>pellet</i> fique o mais limpo possível.
6	Ressuspender o <i>pellet</i> em 800 µL de TKM2. Transferir para um <i>ependorf</i> de 2 mL, utilizando uma ponteira azul. Procurar desmanchar o <i>pellet</i> o máximo possível utilizando o vórtex.
7	Adicionar 50 µL de SDS 10%. Agitar e incubar durante 20 minutos a 55 °C.
8	Adicionar 300 µL de NaCl 6M no tubo e agitar bem por inversão.
9	Centrifugar em uma microcentrifuga a 12000 RPM, durante 15 minutos.
10	Coletar o sobrenadante em um tubo e desprezar o <i>pellet</i> de proteínas.
11	Adicionar ao sobrenadante dois volumes de etanol 100% à temperatura ambiente e inverter o tubo suavemente até o DNA aparecer.
12	Com o auxílio de uma P1000, coletar 300 µl deste álcool com o DNA e transferir para um <i>ependorf</i> . Cuidar para pegar "todo" o DNA presente. Centrifugar na microcentrifuga por cinco minutos a 12000 RPM. Por inversão colocar fora o sobrenadante (que é o álcool). O DNA estará no fundo do tubo.
13	Adicionar 200 a 500 µL de TE. Inverter suavemente. Levar à geladeira e deixar por dois dias. Após armazenar no <i>freezer</i> .

um *freezer* do Laboratório de Biologia Molecular da Univates. As extrações ocorreram, posteriormente, neste mesmo laboratório.

Para avaliar o sucesso da extração de DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel agarose 1%, a uma voltagem de 100 V, durante uma hora. Após, o gel foi analisado sob luz ultravioleta, para verificar a quantidade de DNA e o grau de degradação da amostra bruta.

A concentração do DNA obtido e a pureza das amostras foram avaliadas por meio do espectrofotômetro BioSpec-nano, Shimadzu.

A última etapa para avaliar a qualidade do DNA extraído foi a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *primers* CAG (358 pb)¹⁹, utilizando 1 µL de DNA para todas as amostras. Posteriormente, foi realizado PCR usando 0,5 µL de DNA das amostras dos dois detergentes líquidos; e para aquelas do sabão em pó foram utilizadas repetições com 1 µL, 0,5 µL e 0,3 µL de DNA.

Resultados e discussão

Na etapa de extração de DNA genômico de sangue periférico humano, observou-se, a olho nu, grande quantidade de DNA extraído no final do processo nas amostras em que se utilizou o reagente de lise Nonidet P-40, na dosagem de 250 µL; e no sabão em pó (Ypê), nas concentrações de 30 mg/mL e 40 mg/mL. Quando utilizados os outros reagentes ou dosagens diferentes das descritas anteriormente, visualizou-se pequeníssima ou nenhuma quantidade de DNA. Ao medir a concentração do DNA, a técnica utilizando o reagente Nonidet P-40, na dose de 250 µL foi a mais satisfatória, obtendo-se a média de 141,10 µL/mL. Seguindo do sabão em pó na concentração de diluição de 40 mg/mL, obtendo-se a média de 97,36 µL/mL, conforme descrito na Tabela 2.

Em relação à quantidade de DNA no momento da precipitação, as amostras extraídas com o Nonidet P-40 na dosagem de 250 µL foram as que permitiram visualização de maior quantidade de DNA. Porém, é interessante ressaltar que as amostras extraídas com o sabão em pó (Ypê) nas concentrações de 30 e 40 mg/mL apre-

sentaram bastante precipitação de DNA também. Este resultado sugere que tanto o Nonidet P-40, como o sabão em pó são adequados para a lise das membranas citoplasmáticas, permitindo a extração de grande quantidade de DNA. Durante o processo de extração, percebeu-se que nas amostras que foram utilizados os detergentes líquidos a quebra da associação do DNA com proteínas e demais partículas foi bem mais difícil, impossibilitando a lavagem adequada na extração. O que sugere a inviabilidade do uso de detergentes líquidos para a lise das membranas.

Autores levantaram a hipótese de que o sucesso em relação à quantidade de DNA obtido com o sabão em pó foi pela existência de proteases em sua composição, havendo liberação de DNA¹⁷. Entretanto, outros autores discordaram parcialmente desta hipótese¹⁸. Em seus experimentos, Nasiri et al.¹⁸ constataram que não houve significativa diferença nos resultados obtidos com dois tipos de detergentes (biológicos, que contêm enzimas obtidas de micro-organismos, como bactérias e fungos, e não biológicos) e concluíram que não há um agente principal que permite o isolamento do DNA, e sim há junção de várias das substâncias químicas que são comuns aos sabões em pó comerciais.

Os resultados obtidos na eletroforese em gel agarose das amostras brutas, conforme exposto na Figura 1, mostraram que as extraídas utilizando Nonidet P-40 na dosagem de 250 µL e sabão em pó foram as que apresentaram as ban-

das mais significativas, sugerindo grande quantidade de DNA. O restante das amostras com as outras dosagens de reagentes não apareceu ou teve quantidade insignificante de DNA. É interessante ressaltar que para o Nonidet P-40 as bandas foram um pouco mais expressivas e tanto com o Nonidet P-40 quanto com o sabão em pó, não se visualizou rastros no gel, o que sugere DNA de alto peso molecular pouco degradado. Também é importante notar que os resultados do gel foram concordantes com o observado no momento da extração de DNA, uma vez que somente nas amostras extraídas com Nonidet P-40 e sabão em pó conseguiu-se visualizar a precipitação do DNA em grande quantidade.

A pureza do DNA genômico medida pela relação de absorvância 260/280 foi satisfatória, principalmente nas amostras extraídas com o Nonidet P-40 na dosagem de 250 µL e no sabão em pó de todas as concentrações (20, 30 e 40 mg/mL), conforme Tabela 2. Todas as demais amostras apresentaram índices maiores ou menores do índice adequado, indicando provável contaminação por compostos carboxílicos como acetatos ou EDTA.

Nos resultados referentes à PCR realizada para todas as amostras, apenas as extraídas com o Nonidet P-40 resultaram em amplificação do DNA. Ainda dentre estas, somente aquelas extraídas com 250 µL de Nonidet P-40 obtiveram bons resultados na amplificação aparecendo a banda esperada de 358 pb. Nas demais dosagens

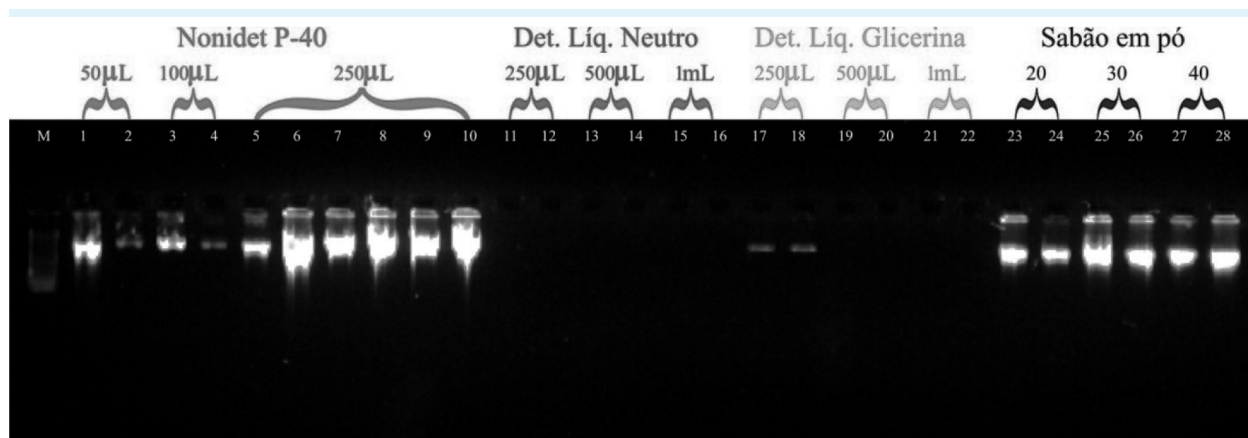


Figura 1: Amostras brutas aplicadas na eletroforese em gel

Tabela 2: Médias da concentração e relação de absorvância 260/280 obtidas por cada reagente utilizado na extração de DNA genômico

Reagente	Quantidade utilizada	Média da concentração do DNA ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Média da absorvância relação 260/280
Nonidet P-40	50 μL	62,12	2,08
Nonidet P-40	100 μL	39,10	2,30
Nonidet P-40	250 μL	141,10	1,88
Detergente líquido neutro (Ypê)	250 μL	22,68	3,13
Detergente líquido neutro (Ypê)	500 μL	15,98	1,33
Detergente líquido neutro (Ypê)	1 mL	17,84	1,6
Detergente líquido de glicerina (Limpol)	250 μL	23,75	2,00
Detergente líquido de glicerina (Limpol)	500 μL	18,16	2,87
Detergente líquido de glicerina (Limpol)	1 mL	19,87	2,68
Sabão em pó (Ypê)	330 μL (20 mg/mL)	52,67	1,83
Sabão em pó (Ypê)	330 μL (30 mg/mL)	84,74	1,71
Sabão em pó (Ypê)	330 μL (40 mg/mL)	97,36	1,92

com Nonidet P-4 não houve amplificação adequada do DNA. Como só foi possível a amplificação pela PCR utilizando amostras extraídas apenas com o reagente Nonidet P-40, mas durante o processo de extração também se visualizou grande presença de DNA nas amostras utilizando o sabão em pó, realizou-se novamente a PCR nas amostras dos detergentes líquidos e

em pó com menores quantidades de DNA, pois se supôs que poderia existir algum inibidor da reação nestas amostras. Foi utilizada a quantidade de 0,5 μL de DNA (ao invés de 1 μL) para o detergente líquido. Para as amostras de DNA extraídas com sabão em pó, utilizou-se 1 μL novamente e também repetições com 0,5 μL e 0,3 μL de DNA. Este resultado mostrou que as amostras de DNA extraídas tanto com o sabão em pó quanto com os detergentes líquidos, mesmo em quantidades menores, não foram adequadas para amplificação.

Uma vez que os resultados relativos à amplificação e pureza do DNA foram mais expressivos com o Nonidet P-40, este parece ser o detergente mais adequado para utilização em procedimentos de pesquisa e diagnóstico. Entretanto, levando em consideração que foi possível extrair grande quantidade de DNA e visualizá-lo tanto com o reagente Nonidet P-40 como com sabão em pó, este reagente caseiro pode ser mais adequado para o uso em sala de aula, em relação ao custo e disponibilidade. Segundo Pereira, Campos e Bonetti²⁰, a aplicação de técnicas de extração de DNA em sala de aula permite ao aluno participar de uma atividade experimental investigativa, em que ele analisa as diversas hipóteses envolvidas na situação apresentada, contribuindo para a construção do conhecimento. Carmo e Schimin²¹ testaram em sua pesquisa a eficiência da utilização da modalidade exposição teórica e modalidade exposição teórico-prática no ensino de Ciências e Biologia por meio do estudo do assunto DNA. O resultado apontou que a modalidade exposição teórico-prática é muito mais eficaz para aquisição de conhecimento pelos alunos, demonstrando a importância do uso da prática de extração de DNA nas salas de aula.

Conclusão

Os resultados desta pesquisa sugerem que Nonidet P-40 é o reagente mais eficaz para extração de DNA, porque além de apresentar me-

lhores resultados em relação à quantidade e pureza de DNA extraído também foi o único que permitiu a amplificação por PCR. Uma vez que a PCR é a técnica mais utilizada nos estudos que envolvem biologia molecular, e serve como base para várias outras técnicas, o uso deste reagente parece ser o mais indicado. Quanto ao sabão em pó, este permite boa quantidade de extração de DNA, mas não apresenta a mesma qualidade do Nonidet P-40 na aplicação em técnicas moleculares, podendo ser utilizado com fins didáticos em aulas práticas para ensino fundamental e graduação.

Agradecimentos

Os autores agradecem a toda equipe do Grupo de Pesquisa em Diabéticos Hipertensos e Fitoterápico e Laboratório de Bioquímica da Univates que auxiliaram nas coletas das amostras sanguíneas dos voluntários, à funcionária Bruna Jordon do Laboratório de Biologia Molecular pelo auxílio na manipulação de equipamentos e diversos procedimentos da pesquisa, à Fundação e Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), processo nº 11/1994-8, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Centro Universitário Univates pelo auxílio financeiro.

Referências

- Dolinsky LC, Pereira LMCV. DNA forense: artigo de revisão. *Saúde & Ambiente em Revista*. 2007;2(2):11-22.
- Rohland N, Hofreiter M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. *Nat Protocols*. 2007;2(7):1756-62.
- Caudron AK, Negro SS, Muller CG, Boren LJ, Gemmell N J. Hair sampling and genotyping from hair follicles: a minimally-invasive alternative for genetics studies in small, mobile pinnipeds and other mammals. *Mar Mammal Sci*. 2007;23:184-92.
- Bueno V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(4):233-4.
- Isola J, DeVries S, Chu L, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol*. 1994;145(6):1301-8.
- Teles PHG, Maulais AS, Oliveira AV. Padronização de protocolos de extração de DNA das espécies de aves *Oryzoborus angolensis* e *Oryzoborus maximiliani*. *Anais VII Encontro Internacional de Produção Científica*; 25 - 28 de outubro 2011; Paraná, Brasil. Paraná, CESUMAR; 2011.
- Libório TN, Etges A, Neves AC, Mesquita RA, Nunes FD. Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years. *J Bras Patol Med Lab*. 2005;41(6):405-10.
- Barea JA, Pardini MIMC, Gushiken T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2004;26(4):274-81.
- Abrão MG, Billerbeck AEC, Nishi MY, Marui S, Mendonça BB. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene *PROP1*. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2005;49(6):978-82.
- Miller S, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
- Weber GR, Disner GR, Nicolau LS, Giovanaz G, Trott A, Borba G. Uso de solução salina (NaCl) na extração de DNA a partir de bulbo capilar. *Evidência*. 2010;10(1-2):115-20.
- Rivero CRE, Neves CA, Valenzuela SGM, Sousa MOS, Nunes DF. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathology – Research and Practice*. 2006;202:523-9.
- Lahiri DK, Nurnberg JI. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19): 5444.
- Cardozo DM, Guelsin GA, Clementino SL, Melo FC, Braga M A, Souza C, et al. Extração de DNA a partir de sangue humano coagulado para aplicação nas técnicas de genotipagem de antígenos leucocitários humanos e de receptores semelhantes à imunoglobulina. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(6):651-6.

15. John SW, Weitzner G, Rozen R, Sriver CR. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(2):408.
16. Rodrigues CDN, Almeida AC, Furlan CM, Tanigushi DG, Santos DYAC, Chow F, et al. DNA vegetal em sala de aula. Departamento Botânica – IBUSP; 2008.
17. Drábek J, Petrek M. A sugar, laundry detergent, and salt method for extraction of deoxyribonucleic acid from blood. *Biomed Papers.* 2002;146(2):37-9.
18. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasae MJ, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *J Clin Lab Anal.* 2005;19:229-32.
19. Silva Neto B, Koff WJ, Biolochi V, Brenner C, Biolo KD, Spritzer PM, et al. Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest.* 2008;26(1):74-80.
20. Pereira BB, Campos EO, Bonetti AM. Extração de DNA por meio de uma abordagem experimental investigativa. *Genética na Escola.* 2010;5(2):20-2.
21. Carmo S, Schimin ES. O ensino da Biologia através da experimentação [acesso em 2013 marc 14]. Disponível em: www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/portals/pde/arquivos/1085-4.pdf.