

Avaliação de um Protocolo de Extração de DNA Genômico a Partir de Sangue Total

Flávio Ribeiro de Araújo¹

Carlos Alberto do Nascimento Ramos²

Hera Luana Luíz³

Igor Alexandre Hany Fuzeta Schabib Péres⁴

Renato Henrique Marçal Oliveira⁵

Ingrid Ieda Fernando de Souza⁶

Livia dos Santos Russi⁷

Introdução

Com o advento das técnicas de biologia molecular, o diagnóstico de agentes infecciosos evoluiu dramaticamente. A reação em cadeia da enzima DNA polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*) (MULLIS, et al., 1987) tem sido aplicada ao diagnóstico de inúmeros organismos (bactérias, vírus, protozoários) em diferentes espécies animais (MADRUGA et al., 2003; KE et al., 2006; CARELLI et al., 2007). Em bovinos, essa técnica possibilitou um diagnóstico mais acurado e o melhor entendimento epidemiológico, por meio da identificação de animais portadores assintomáticos, de muitos agentes infecciosos como, por exemplo, a riquetisíase *Anaplasma marginale* e os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (ADHAM et al., 2009; OOSHIRO et al., 2009).

A PCR consiste na amplificação *in vitro* de fragmentos de DNA delimitados por um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), pela ação da enzima DNA polimerase, a partir de uma fita molde de DNA. Portanto, o DNA molde é o primeiro fator limitante de uma bem sucedida reação de PCR.

Uma grande variedade de métodos estão disponíveis hoje, inclusive comercialmente, para extração de ácidos nucleicos a partir dos mais variados tecidos (sangue, pelos, ossos, etc.), cada um com suas vantagens e desvantagens. Para extração de DNA a partir de sangue total, os kits disponíveis comercialmente, em geral, resultam em purificações de boa qualidade para utilização nas mais variadas técnicas moleculares, dentre as quais a PCR. Porém tem como principal desvantagem um alto custo por amostra (em torno de R\$ 6,00), maior inclusive do

¹ Médico-Veterinário, Ph.D. em Imunologia, pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, flabio@cnpqg.embrapa.br

² Médico-Veterinário, M.Sc., aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, carlosanramos@yahoo.com.br

³ Bióloga, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, heraluana@hotmail.com

⁴ Médico-Veterinário, Aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, igorale_vet@hotmail.com

⁵ Químico, Assistente A, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, renato@cnpqg.embrapa.br

⁶ Bióloga, aluna do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS, ingridsbio2005@gmail.com

⁷ Médica-Veterinária, M.Sc., bolsista de Desenvolvimento Tecnológico Industrial DTI Embrapa/CNPq, Campo Grande, MS, livia_russi@hotmail.com

que o custo de uma reação de PCR hoje (em torno de R\$ 1,20). Portanto, o objetivo nesse trabalho foi avaliar um protocolo de extração de DNA de sangue total, para utilização principalmente em PCR, rápido, de baixo custo e comparável aos kits comerciais de extração.

Metodologia

Foram utilizadas 30 amostras frescas de sangue bovino (*Bos taurus*), oriundos de Campo Grande-MS, coletadas com EDTA. Cada amostra foi submetida a extração de DNA com o kit *Easy DNA* (Invitrogen), conforme metodologia descrita pelo fabricante, e utilizando-se um protocolo *in house* denominado “Protocolo Embrapa Gado de Corte”, descrito abaixo:

Protocolo de extração de DNA de amostras de sangue “Embrapa Gado de Corte”

- Adicionar 350 µL de sangue em um tubo de polipropileno de 2 mL.
- Acrescentar 500 µL de SDS 20%, homogeneizar em *vortex* e incubar a 65°C por 6 minutos.
- Remover o tubo da incubação e adicionar 400 µL de clorofórmio. Agitar vigorosamente em *vortex* até completa homogeneização.
- Acrescentar 300 µL de solução de precipitação protéica e homogeneizar novamente em *vortex*.
- Centrifugar a 10.000 x g por 10 minutos.
- Pipetar a fase aquosa e transferi-la para um novo tubo.
- Adicionar 1 mL de etanol 100% ou isopropanol, homogeneizar por inversão e centrifugar a 10.000 x g por 5 minutos.
- Desprezar o sobrenadante e acrescentar 1 mL de etanol 70%.
- Centrifugar novamente por 2 minutos a 10.000 x g e desprezar o sobrenadante.
- Centrifugar novamente por 1 minuto e retirar o resíduo de etanol com o auxílio de uma micropipeta.
- Inverter o tubo para secagem do sedimento (aproximadamente 10 minutos).
- Adicionar 100 µL de água livre de nucleases ou tampão TE e homogeneizar lentamente.
- Incubar a 65°C por cinco minutos para completa solubilização do sedimento.

Reagentes

- SDS 20%
 - SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) – 2 g
 - H₂O q.s.p. 10 mL

- Solução de precipitação protéica
 - Acetato de Potássio 5 M - 6 mL
 - Ácido Acético Glacial - 1,1 mL
 - H₂O q.s.p. 10 mL

Após extração, todas as amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotometro *NanoDrop ND-1000* (Thermo Scientific) e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com *Sybr Gold* (Invitrogen) para visualização.

As amostras de DNA bovino foram utilizadas em reações de PCR para *A. marginale* com os primers *msp5* F: 5' CGCAGATCTAGCAAAATCGGCGAGA-GGTTTACCACTTC 3' e *msp5* R: 5' GCGCTGCAG-TGGCGCAAAATGCCCGACATACC 3' conforme descrito em Melo et al. (2007).

Adicionalmente, 21 amostras de sangue de búfalo (*Bubalus bubalis*) e 20 amostras de sangue de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), estocadas a -20°C, também foram submetidas a extração com o protocolo Embrapa Gado de Corte, quantificadas e visualizadas conforme descrito anteriormente.

As concentrações médias de DNA bovino, assim como as médias da razão A260/A280 nm foram comparadas pelo teste de *t* de *Student*.

Resultados e Discussão

A comparação entre as extrações realizadas com kit comercial *Easy DNA* e o protocolo Embrapa Gado de Corte está resumida na Tabela 1.

Não se observou diferença significativa ($P = 0,54$) entre as concentrações médias de DNA bovino extraído com as duas metodologias. Os níveis de pureza, representados pela razão entre as absorvâncias a 260 nm e 280 nm, também não diferiram significativamente ($P = 0,48$).

Após eletroforese em gel de agarose, as amostras de DNA de sangue bovino extraídas com o protocolo Embrapa-CNPGC apresentaram perfil similar às amostras extraídas com kit comercial (Figura 1).

Tabela 1. Resultado comparativo das extrações de DNA a partir de sangue bovino realizadas com o protocolo *in house* Embrapa Gado de Corte e o kit comercial *Easy DNA* (Invitrogen).

Amostra	Protocolo Embrapa Gado de Corte		Kit <i>Easy DNA</i>	
	Concentração	$\eta\text{g}/\mu\text{L}$	Concentração	$\eta\text{g}/\mu\text{L}$
1	60,34	1,86	61,35	1,91
2	13,86	1,91	12,86	1,89
3	66,02	1,90	65,08	1,80
4	82,66	1,89	80,06	1,86
5	101,94	1,87	105,20	1,88
6	80,82	1,98	80,30	1,96
7	69,91	1,85	66,96	1,79
8	93,39	1,97	91,55	1,99
9	104,86	1,78	103,14	1,80
10	75,90	1,77	77,59	1,80
11	2,40	1,58	3,60	1,55
12	89,56	1,82	90,45	1,79
13	18,43	2,06	20,18	1,99
14	12,14	2,00	11,56	2,04
15	52,71	1,94	46,70	1,98
16	118,06	1,89	120,20	1,84
17	112,10	1,79	109,56	1,80
18	87,69	1,80	85,90	1,77
19	68,62	1,86	65,88	1,89
20	102,59	1,86	104,36	1,90
21	104,80	1,89	108,56	1,88
22	99,86	1,94	102,60	1,96
23	125,40	2,00	135,20	2,04
24	116,58	2,01	119,20	1,86
25	79,56	1,79	80,60	1,88
26	130,65	1,80	128,56	1,96
27	129,36	1,96	134,78	2,00
28	112,87	2,05	109,45	1,98
29	98,67	1,99	96,50	1,96
30	100,89	2,01	105,60	1,80
Média	83,75	1,89	84,11	1,88
Variação (mín-max)	2,40–130,65	1,58–2,06	3,60–128,56	1,55–2,04

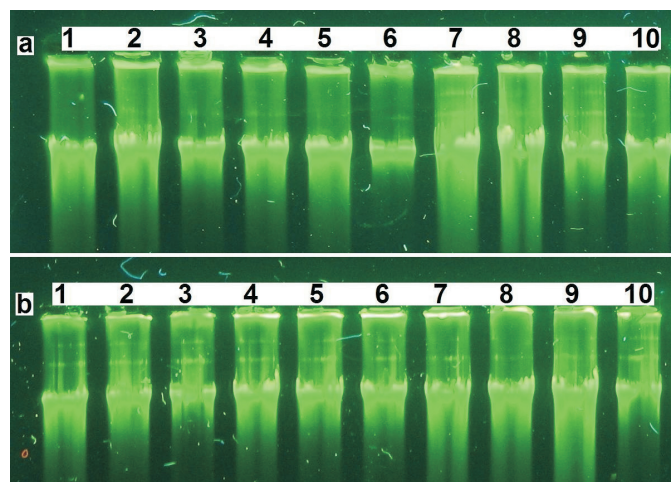
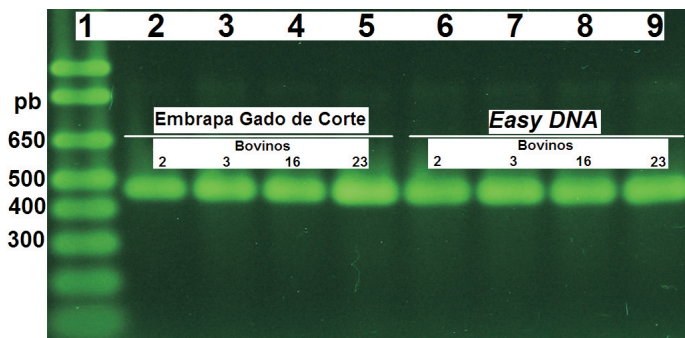


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8% das extrações de DNA a partir de 350 μL de sangue de 10 bovinos, utilizando-se o protocolo Embrapa Gado de Corte (a) e o kit *Easy DNA* (Invitrogen) (b).

As PCRs para *A. marginale* realizadas com as amostras de DNA bovino extraídas com as duas metodologias, detectaram 4 animais positivos entre os 30 analisados (Figura 2).

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% de PCRs para o gene *msp5* de *Anaplasma marginale*, utilizando-se amostras de DNA extraídas de sangue bovino por meio do protocolo Embrapa Gado de Corte e kit *Easy DNA* (Invitrogen); 1: Marcador de pares de base 1Kb Plus (Invitrogen); 2-5: PCR realizada com amostras de DNA extraídas seguindo o protocolo Embrapa Gado de Corte; 6-9: PCR realizada com amostras de DNA extraídas com kit *Easy DNA*.



Os resultados de concentração e pureza (A260/280) das amostras de DNA extraídas de sangue de búfalos e cervídeos podem ser visualizados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2. Resultados da extração de DNA a partir de sangue de búfalos (*Bubalus bubalis*) com o protocolo Embrapa Gado de Corte.

Amostra	Concentração ng/ µL	A260/A280
1	8,61	1,71
2	9,81	1,62
3	14,04	1,28
4	8,15	1,51
5	14,56	1,49
6	23,52	1,80
7	17,25	1,66
8	46,12	1,82
9	49,28	1,80
10	7,810	1,33
11	6,84	1,65
12	16,42	1,70
13	8,01	1,40
14	27,26	1,77
15	16,38	1,57
16	31,70	1,81
17	44,49	1,82
18	50,83	1,90
19	30,91	1,70
20	38,17	1,79
21	41,47	1,81
Média	24,36	1,66
Variação (mín-max)	6,84 – 50,83	1,28 – 1,90

Tabela 3. Resultados da extração de DNA a partir de sangue de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) com o protocolo Embrapa Gado de Corte.

Amostra	Concentração ng/ µL	A260/A280
1	66,24	2,03
2	66,85	2,11
3	73,05	1,98
4	87,30	1,93
5	75,23	1,89
6	20,47	1,96
7	52,90	1,98
8	55,37	1,8
9	83,18	2,00
10	93,85	1,90
11	28,25	1,91
12	58,29	1,99
13	77,59	1,87
14	76,11	1,85
15	91,38	1,96
16	91,55	2,05
17	20,58	1,90
18	103,14	1,88
19	166,34	1,94
20	86,77	2,01
Média	73,72	1,94
Variação (mín-max)	20,47 – 166,34	1,80 – 2,11

O protocolo de extração apresentado aqui foi capaz de recuperar DNA a partir de sangue de três diferentes espécies ruminantes com concentrações e pureza satisfatórias para utilização em PCR, tanto em amostras frescas, quanto em amostras estocadas a -20°C. O grau de pureza de amostras de DNA é avaliado pela razão entre as absorbâncias a 260 nm e 280 nm. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteínas, no entanto, valores tão baixos quanto 1,4 ainda são considerados satisfatórios para utilização em reações de PCR (REGITANO, 2001; LEE et al., 2010).

O protocolo de extração Embrapa Gado de Corte mostrou-se também uma metodologia de rápida execução (aproximadamente 30 minutos), comparável ao tempo de execução de kits comerciais de extração como *Easy DNA* – Invitrogen (Manual de Instruções). Outra vantagem do protocolo de extração de DNA apresentado aqui foi seu baixo custo por amostra (em torno de R\$ 0,16).

Conclusão

O protocolo de extração de DNA genômico de sangue total Embrapa Gado de Corte mostrou eficiência similar ao kit de extração comercial com sangue total bovino, e foi capaz de extrair DNA com concentração e pureza satisfatórias a partir de sangue de búfalos e cervos. Portanto, o protocolo aqui apresentado representa uma boa alternativa aos kits comerciais de extração de DNA a partir de sangue.

Referências

- ADHAM, F. K.; ABD-EL-SAMIE, E. M.; GABRE, R. M.; EL-HUSSEIN, H. Detection of tick blood parasites in Egypt using PCR assay I-*Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 105, n. 3, p. 721-730, 2009.
- CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGlia, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 124, p. 107-114, 2007.
- KE, G. M.; CHENG, H. L.; KE, L. Y.; JI, W. T.; CHULU, J. L. C.; LIAO, M. H.; CHANG, T. J.; LIU, H. J. Development of a quantitative Light Cycler real-time RT-PCR for detection of avian reovirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 133, p. 6-13, 2006.
- LEE, J. H.; PARK, Y.; CHOI, J. R.; LEE, E. K.; KIM, H. S. Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory. **Yonsei Medical Journal**, Seoul, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2010.
- MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O.; MELO, E. S. P.; ALMEIDA, D. A.; ALMEIDA JUNIOR, N. F.; XAVIER, M. A. S.; OSÓRIO, A. L. A.; GÔES-CAVALCANTE, G.; RAMOS, C. A. N. **Diagnóstico molecular e análise filogenética de isolados brasileiros de *Trypanosoma vivax* baseado na reação da polimerase em cadeia – PCR**. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2003, 5p. (Embrapa Gado de Corte, Comunicado Técnico, 84).
- MELO, E. S. P.; ARAÚJO, F. R.; RAMOS, C. A. N.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ELISEI, C.; MADRUGA, C. R. ELISA com MSP5 recombinante para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 27, n.7, p.301-306, 2007.
- MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.
- OOSHIRO, M.; ZAKIMI, S.; MATSUKAWA, Y.; YAFUSO, M.; KATAGIRI, Y.; INOKUMA, H. *Anaplasma marginale* infection in a Japanese black cow 13 years after eradication of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Okinawa, Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 160, p. 351-355, 2009.
- REGITANO, L.C.A. **Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR)**. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. eds. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001, p. 180-186.

CGPE 8534

Comunicado Técnico, 120

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Gado de Corte**
Endereço: Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368-2083
Fax: (67) 3368-2083
E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

1ª edição
 Versão online (2009)

**Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento**



Comitê de publicações

Presidente: Cleber Oliveira Soares
Secretário-Executivo: Grácia Maria S. Rosinha
Membros: Fabiane Siqueira, Ecila Carolina N. Z. Lima, Elane de Souza Salles, Grácia Maria S. Rosinha, Jaqueline Rosemeire Verzignassi, Lucimara Chiari, Paulo Henrique Nogueira Biscola, Roberto Giolo de Almeida, Rodrigo Amorim Barbosa

Expediente

Supervisão editorial: Ecila Carolina N. Zampieri Lima
Revisão de texto: Lúcia Helena Paula do Canto
Editoração eletrônica: Ecila Carolina N. Zampieri Lima