



Extração Rápida e Fácil de RNA a partir de Diferentes Tecidos de Algodoeiro

Roseane Cavalcanti dos Santos¹

Elizabeth Amélia Alves Duarte²

Péricles de Albuquerque Melo Filho³

Liziane Maria de Lima⁴

Carlíane Rebeca Coelho da Silva⁵

Morganna Pollynné Nóbrega Pinheiro⁵

Vandré Guevara Lyra Batista⁶

Introdução

A planta do algodoeiro é conhecida pela sua composição tissular, rica em compostos fenólicos, tais como terpenóides e outros metabólitos secundários que promovem degradação e oxidação dos ácidos nucléicos durante os procedimentos de extração de seus diferentes tecidos (DABO; MITCHELL; MELCHER, 1993; WU; LLEWELLYN; DENNIS, 2002). O isolamento de RNA íntegro e de boa qualidade a partir de tecidos vegetais é fundamental para muitos estudos em nível molecular, no que diz respeito a análises de expressão gênica como RT-PCR e construção de bibliotecas de cDNA. A presença de compostos fenólicos e de polissacarídeos pode interferir no isolamento ou na qualidade do RNA. A maioria dos métodos de extração de RNA é baseada em precipitação por guanidina (DOLFERUS et al., 1994; LOGEMANN; SCHELL; WILLMITZER, 1987), bórax (WAN; WILKINS, 1994), CTAB (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY et al., 1993) ou *kits* comerciais diversos. O que diverge entre a escolha desses métodos é a concentração e pureza do RNA obtido, associado a

alguns entraves peculiares a cada um deles, como, por exemplo, a grande quantidade de tecido requerida e a necessidade de precipitar com cloreto de lítio por um período igual ou superior a 12 horas.

Neste documento, apresenta-se um protocolo de extração fácil e rápido de RNA a partir de tecidos de algodoeiro, cujos procedimentos não necessitam de ultrarefrigeração. Para a boa resolução do RNA, visando evitar a contaminação por fenóis e a consequente oxidação, foi utilizado PVP (polivinilpirrolidona), que se liga a polissacarídeos, fenóis e outros compostos (VASANTHAIAH; KATAM; SHEIKH, 2008) e o β -mercaptoetanol, que facilita a lise celular e atua como agente redutor, reduzindo as pontes dissulfetos e desnaturando proteínas, incluindo RNases (AINSWORTH, 1994; JOHN, 1992). Utilizou-se também uma solução de FCA (fenol: clorofórmio: álcool isoamílico, 25:24:1 - v/v/v) visando a desproteinização, remoção de contaminantes e melhor recuperação de RNA. A aplicação de cloreto de lítio (LiCl) foi utilizada para auxiliar na precipitação seletiva oferecendo vantagens sobre outros métodos, pois este

¹Engenheira agrônoma, D.Sc. em Biologia molecular, pesquisadora da Embrapa Algodão, Campina Grande, PB, caval@cnpa.embrapa.br

²Bióloga, M.Sc. em Melhoramento de Plantas, UFRPE, Recife, PE. elizabethaad@gmail.com

³Engenheiro agrônomo, Dr. em Fitopatologia, UFRPE, pericles@depa.ufrpe.br

⁴Bióloga, D.Sc. em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Algodão, liziane@cnpa.embrapa.br

⁵Bióloga, B.Sc. mestranda em Melhoramento de Plantas, UFRPE, carliane.rebeca@gmail.com; morgana@

⁶Graduando do curso de Ciências Biológicas da UEPB, Campina Grande, PB, estagiário da Embrapa Algodão, vanguarda@gmail.com

não precipita eficientemente DNA, proteínas e carboidratos (BARLOW et al., 1963). Além disso, o LiCl é mais solúvel em etanol que acetato de sódio (NaA) utiliza pouco tecido vegetal, exige poucos reagentes e não requer filtração por membrana, o que minimiza seu custo. Além disso, a centrifugação é feita em temperatura ambiente, podendo ser reproduzido em laboratórios com limitação de equipamentos mais sofisticados.

Material e Métodos

1. Macerar 400 mg de tecido em um cadinho contendo nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino e transferir para um microtubo (1,5 mL) contendo 1 mL de tampão citrato de sódio 5 mmol L⁻¹ pH 7,0, acrescido de 0,1 % β-mercaptoetanol (1 μL) e 2 % de PVP (200 μL de PVP 10%);
2. Verter o tubo durante 1 minuto para misturar a amostra e adicionar 400 μL de FCA (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, 25:24:1, v/v/v);
3. Verter o tubo durante 1 minuto para misturar a amostra e deixar o tubo na bancada por 5 minutos em temperatura ambiente;
4. Centrifugar a 10.000 rpm (9000 x g) por 3 minutos em temperatura ambiente;
5. Transferir o sobrenadante para um novo tubo previamente gelado e conservar no gelo;
6. Adicionar 1,4 mL de LiCl 4 M e estocar o tubo por 2 horas à 4°C;
7. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
8. Descartar o sobrenadante e adicionar 1 mL de etanol 70% gelado;
9. Estocar o tubo por 5 minutos a -20°C;
10. Centrifugar a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente;
11. Descartar o sobrenadante, dar um spin rápido e retirar o etanol residual com o auxílio de uma pipeta;
12. Deixar secar na bancada e ressuspender em 20 μL de H₂O ultrapura;

13. Analisar em gel de agarose 1 % em condição desnaturante ou nativa.

Resultados e Discussão

O método proposto para a extração de RNA rende uma quantidade de RNA de boa qualidade, dependendo do tecido vegetal. Somente quando utilizado tecidos de folhas obteve-se uma quantidade muito pequena de RNA, comparado ao RNA obtido a partir de hastes e raízes (Figura 1). Isso sugere que o RNA de folhas pode ter sido perdido por ligação a polissacarídeos, polifenóis ou outros componentes durante a extração (VASANTHAIAH et al., 2008). Apesar da utilização de PVP insolúvel que facilita a remoção de muitos dos polifenóis e polissacarídeos, ajudando na dissociação desses compostos (AINSWORTH, 1994). A integridade do RNA é evidente no gel de agarose nativo a 1 %, podendo se ver as bandas correspondentes a 28s e 18s (Figura 1).

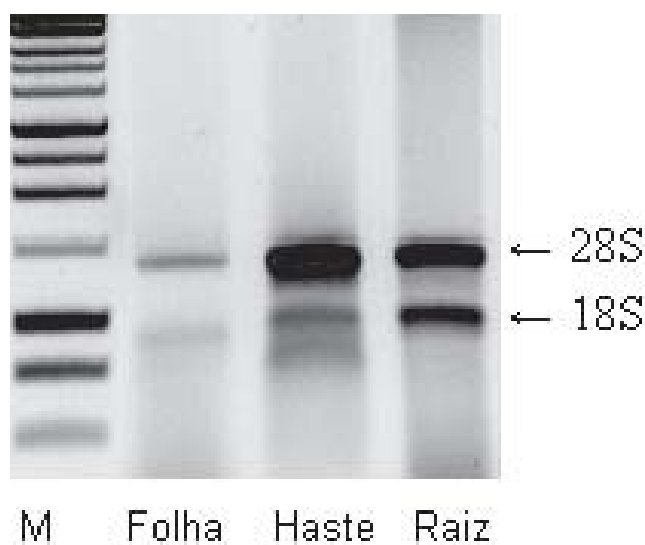


Fig. 1. RNA total em gel de agarose (1%). M - marcador 1 kb DNA ladder.

Conclusão

Este protocolo resulta em uma boa recuperação de RNA íntegro e de boa qualidade, variando em rendimento entre os tecidos utilizados.

Referências

AINSWORTH, C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (sorrel). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 3, p. 198-203. 1994.

BARLOW, J. J.; MATHIAS, A. P.; WILLIAMSON, R.; GAMMACK, D. B. A Simple Method for the Quantitative Isolation of Undegraded High Molecular Weight Ribonucleic Acid. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, v. 13, n. 61, p. 66. 1963.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Report**, v. 11, p. 113-116. 1993.

DABO, S. M.; MITCHELL, E. D.; MELCHER, U. A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) leaves. **Analytical Biochemistry**, v. 210, p. 34-38. 1993.

DOLFERUS, R.; JACOBS, M.; PEACOCK, W. J.; DENNIS, E. S. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the Arabidopsis Adh gene. **Plant Physiology**, v. 105, p. 1075-1087. 1994.

JONH, M. E. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plant containing polyphenolics. **Nucleic**

Acids Research, v. 20, n. 9, p. 2381. 1992.

LOGEMANN, J.; SCHELL, J.; WILLMITZER, L. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 163, p. 16-20. 1987.

VASANTHAIAH, H. K. N.; KATAM, R.; SHEIKH, M. B. Efficient protocol for isolation of functional RNA from different grape tissue rich in polyphenols and polysaccharides for gene expression studies. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 1-8. 2008.

WAN, C. Y.; WILKINS, T. A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Analytical Biochemistry**, v. 223, p. 7-12, 1994.

WU, Y.; LLEWELLYN, D. J.; DENNIS, E. S. A quick and easy method for isolating good-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 213-218, 2002.

Comunicado Técnico, 365

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Algodão
Endereço: Oswaldo Cruz, 1143 Centenário, CP 174
Fone: (83) 3182 4300
Fax: (83) 3182 4367
E-mail: sac@cnpa.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2009): 500

Ministério da Agricultura,
 Pecuária e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: *Carlos Alberto Domingues da Silva*
Secretário-Executivo: *Renato Wagner da Costa Rocha*
Membros: *Fábio Aquino de Albuquerque, Giovani Greigh de Brito, João Luis da Silva Filho, Máira Milani, Maria da Conceição Santana Carvalho, Nair Helena Castro Arriel, Valdinei Sofiatti, Wirton Macêdo Coutinho.*

Expediente

Supervisão editorial: *Renato Wagner da Costa Rocha.*
Normalização bibliográfica: *Valter Freire de Castro.*
Tratamento das ilustrações: *Geraldo F. de S. Filho.*
Editoração eletrônica: *Geraldo Fernandes de S. Filho.*