

Protocolo de Extração de DNA e RNA de Alta Qualidade para Espécies Ricas em Compostos Secundários

Peter Ward Inglis¹
Marília de Castro Rodrigues Pappas²
Dario Grattapaglia³

Introdução

Existe uma grande quantidade de protocolos descrevendo extração de DNA de plantas. Vários desses protocolos representam formas rápidas e econômicas de obtenção de maior rendimento de DNA quando comparados a *kits* comerciais. No entanto, para um grande número de tecidos e espécies vegetais, protocolos rápidos não são eficazes para a purificação de DNA em quantidade, qualidade e, principalmente, pureza adequadas à aplicação em métodos subsequentes que envolvam, por exemplo, digestão enzimática, amplificação e sequenciamento. Extrações de DNA genômico de espécies ou tecidos ricos em polissacarídeos e polifenóis, frequentemente, apresentam contaminação após a purificação, gerando impacto na eficiência e reprodutibilidade de algumas técnicas. A extração de DNA de algumas espécies, como

caju (*Anacardium occidentale*) e algumas espécies de eucalipto, como *Eucalyptus globulus*, geram *pellets* marrons, bastante escuros, sugerindo grande contaminação com polifenóis que, ao oxidarem, ligam-se covalentemente ao DNA.

Muitos protocolos baseiam-se em modificações do protocolo clássico de extração com brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) (DOYLE; DOYLE, 1987) para melhorar a pureza e o rendimento da extração de DNA. Algumas modificações incluem o aumento da concentração de cloreto de sódio e CTAB no tampão de extração. Entretanto, mostram-se pouco eficazes para uma grande diversidade de espécies e tecidos. Por isso, buscamos alternativas para atender à demanda por um protocolo capaz de atender a diferentes espécies que apresentam esse tipo de problema para purificação de DNA genômico de qualidade.

¹ Biólogo, Ph.D em Biologia Molecular, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

² Bióloga, doutora em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

³ Engenheiro florestal, Ph.D em Ciências Florestais, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Uma alternativa às modificações no protocolo de CTAB é a redução da quantidade de contaminantes extracelulares no tecido vegetal macerado, antes da lise celular e da purificação do DNA, utilizando-se uma solução à base de sorbitol para realizar uma pré-lavagem do tecido. Essa técnica foi testada com sucesso em orquídea, *Polystachya* (Orchidaceae) (RUSSELL et al., n.d.) e em uma espécie arbórea do cerrado, *Dimorphandra mollis* (Leguminosae) (SOUZA et al., 2012) que, com outros protocolos, apresentara contaminação com polissacarídeos mucilaginosos inibitórios da reação de amplificação.

Apresentamos um protocolo versátil para a purificação de DNA genômico de alta qualidade de tecido vegetal rico em polissacarídeos e polifenóis baseado em pré-lavagem do tecido macerado com solução à base de sorbitol (0,35 M) e extração com tampão CTAB 3%. O protocolo foi testado com sucesso em quatro gêneros de plantas utilizando-se diferentes tecidos – folha, câmbio, raiz e fruto – e no fungo filamentosso *Trichoderma*. Após os resultados obtidos para a extração de DNA, um teste preliminar do uso da pré-lavagem com sorbitol foi realizado com sucesso também antes do protocolo de extração de RNA baseada em tampão CTAB (CHANG et al., 1993) com amostras de diversos tecidos de eucalipto e caju.

Material e Métodos

Tampão de lavagem sorbitol: Tris pH 8,0 100 mM, sorbitol 0,35 M, EDTA 5 mM, polivinilpirrolidona (PVP-40) 1% (w/v). O tampão deve ser mantido a 4°C. Imediatamente antes do uso, deve ser adicionado 1% de 2-βmercaptoetanol (βME) (v/v) ao tampão.

Tampão de lise CTAB 3%: Tris pH 8,0 100 mM, NaCl 3 M, CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) 3%, EDTA 20 mM, PVP-40 1% (w/v). O tampão deve ser estocado em temperatura ambiente. Imediatamente antes do uso, deve ser adicionado 1% de 2-βmercaptoetanol (v/v) ao tampão.
CIA: Solução de cloróformio e álcool isoamílico (24:1).

Material biológico

Os melhores resultados de purificação de DNA genômico foram obtidos para amostras de tecido

foliar. Contudo, o protocolo também foi aplicado com sucesso em amostras de câmbio, fruto, raiz e micélio liofilizado de *Trichoderma*. Foram utilizados 100-150 mg de tecido fresco ou uma amostra de cerca de 1,5 cm x 1,5 cm de material seco (tecido foliar em sílica ou amostras de herbário). Uma maceração eficiente do tecido é crucial para um bom rendimento da extração. No caso de preparação de poucas amostras, a maceração em almofariz com nitrogênio líquido, especialmente para tecidos frescos e de maior densidade, é o método de maceração mais eficiente. Entretanto, como a capacidade de processar várias amostras simultaneamente se faz necessária no caso de uma grande amostragem, várias estratégias alternativas foram testadas. A mais eficiente foi a liofilização prévia do tecido fresco e maceração com esferas de aço inoxidável AISI 316 de 2,45 mm (7 a 10 por tubo) em tubos de 2,0 mL. Usualmente, dois a três ciclos de maceração de 20 segundos em macerador automático *Mini Beadbeater* (Modelo 1001, *Biospec Products*, Bartlesville, Oklahoma, EUA) foram suficientes para reduzir o tecido biológico a um pó fino. Alternativamente à liofilização, tecido fresco pode ser congelado, dentro dos tubos de 2,0 mL com as esferas metálicas e no bloco do macerador, a -80°C. Ocasionalmente, tecidos muito resistentes podem precisar ser congelados com nitrogênio líquido antes de ser colocados no bloco do macerador (previamente gelado). Neste caso, a qualidade do tubo é essencial para evitar o rompimento deste durante a maceração e centrifugação após o congelamento.

Extração

A cada tubo contendo o material vegetal macerado, foi adicionado 1,5 mL de tampão de lavagem sorbitol com 2-βmercaptoetanol e o conteúdo misturado por agitação, no macerador, por 10 segundos. Cada tubo deve ser inspecionado para checar se o tecido foi ressuspenso no tampão e, caso necessário, agitado novamente. Os tubos foram centrifugados a 5.000 x g por 5 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado por aspiração, e a lavagem repetida, pelo menos, mais uma vez ou até que o tampão não apresente mais suspensão. Usualmente, dois ciclos de lavagem são suficientes.

Após o descarte da solução à base de sorbitol, a cada tubo foram adicionados 700 μL de tampão

CTAB 3% com de 2-βmercaptoetanol, pré-aquecido a 65°C. O tecido macerado foi ressuspensão no tampão de lise por agitação no macerador por 5 a 10 segundos – as esferas metálicas auxiliam na ressuspensão do material. As amostras foram, então, incubadas em banho-maria a 65°C por 30 a 60 minutos, misturando-se o conteúdo por inversão dos tubos a cada 10 minutos. Os tubos foram resfriados em temperatura ambiente por 5 minutos antes da adição de 700 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA 24:1). Os tubos foram agitados por 10 segundos no macerador e centrifugados a 5.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. Velocidades superiores de centrifugação devem ser evitadas nessa etapa por causa do risco de rompimento dos tubos, especialmente se esferas de diâmetro grande estiverem sendo utilizadas. Cerca de 600 µL da fase superior foram transferidos para um novo tubo, evitando-se perturbar os *debris* presentes entre as fases aquosa e orgânica. Embora, normalmente, não seja necessária, uma segunda extração com CIA pode ser realizada, o que aumenta a pureza do DNA. Sem as esferas metálicas, a velocidade de centrifugação na extração com CIA pode ser aumentada para 13.000 x g por 10 minutos.

Os ácidos nucleicos são, então, precipitados pela adição de 0,10 volume de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 0,66 volume de isopropanol gelado. O conteúdo deve ser misturado por inversão e os tubos mantidos a -20°C por, pelo menos, 1 hora. Segue-se então centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante deve ser descartado e o *pellet* lavado com adição de 1,0 mL de etanol 70%, seguida de centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante deve ser cuidadosamente removido para evitar a perda do *pellet*, que muitas vezes é difícil de visualizar. A secagem deve ser realizada por cerca uma hora em temperatura ambiente ou 10 minutos em vácuo. Os *pellets* foram ressuspensos em 100 µL de tampão Tris EDTA (TE) contendo 0,1 mg/mL de RNase A, e os tubos incubados a 37°C por 30 minutos. A qualidade e integridade do DNA foram checadas em gel de agarose 1%, e a quantificação e avaliação da pureza foram realizadas mediante espectrofotometria em Nanodrop (*Thermo Scientific*).

As esferas de aço inoxidável podem ser reutilizadas em novas extrações após lavagem em água corrente,

imersão em hipoclorito de sódio 10%, enxague em água ultrapura e secagem completa em estufa a 70°C.

No caso da extração de RNA, foram realizadas duas extrações com CIA, as centrifugações foram realizadas a 4°C e os tubos mantidos sempre em gelo para manipulação após a primeira extração com CIA. A integridade das amostras de RNA total foi acessada pela inspeção visual das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1% em tampão TAE, e a quantificação realizada em Nanodrop.

Resultados e Discussão

Incluindo o congelamento ou a liofilização prévia do tecido e cerca de duas pré-lavagens com solução sorbitol, esse protocolo envolve mais passos do que um protocolo usual e, portanto, é mais demorado do que protocolos rápidos. Nas extrações de tecidos de quatro gêneros de plantas e do fungo *Thricoderma*, o sobrenadante, após a primeira lavagem com tampão sorbitol, apresentou-se, usualmente, bastante turvo e, ocasionalmente, com coloração indicativa de oxidação. Tanto a turbidez quanto a oxidação foram significativamente reduzidas após a segunda lavagem e, por isso, lavagens adicionais não foram necessárias. A extração com tampão CTAB foi conduzida com modificações a partir do protocolo original (DOYLE; DOYLE, 1987) pelo uso de 3,0 molar de cloreto de sódio e 3% de CTAB no tampão de extração. Na etapa de extração com CIA, as amostras de tecidos foliares apresentaram sobrenadante especialmente claro e translúcido. Após a precipitação com isopropanol, os *pellets* se apresentaram, usualmente, compactos, incolores e translúcidos. Nenhuma das amostras apresentou *pellet* oxidado, como era comum em amostras de câmbio de *Eucalyptus*, ou esbranquiçado, comum nas amostras de caju, quando a pré-lavagem com tampão sorbitol não era realizada, sugerindo que esse procedimento foi eficiente na remoção de polifenóis e polissacarídeos.

O rendimento médio obtido, estimado por quantificação em Nanodrop, foi suficiente para diversas aplicações em biologia molecular. A média das razões de absorbância a 260 e 280 nanômetros (A 260/280) foi excelente, usualmente superior a 1,8. A razão 260/230 de extrações de DNA de tecido foliar e hifas de fungo variou de 2,05

a 2,40 (Tabela 1). A média da razão 260/230 para amostras de câmbio de *Eucalyptus* foi menor do que as de folhas, o que indica a existência de contaminação residual com polissacarídeos. Contudo, houve redução dessa razão em relação ao resultado observado para extrações realizadas sem a pré-lavagem com tampão sorbitol. A mesma tendência foi observada para testes preliminares em extração de RNA total utilizando-se a pré-lavagem com tampão sorbitol antes do protocolo baseado em CTAB e precipitação com cloreto de lítio (CHANG et al., 1993) (Tabela 2). A integridade do RNA total extraído por meio desse procedimento foi bastante satisfatória, como pode ser observado na Figura 1.

Destaca-se a importância da utilização de 2-βmercaptoetanol no tampão de lavagem à base de sorbitol. Tentativas de utilização desse tampão sem adição de 2-βmercaptoetanol realizadas na extração de RNA total de câmbio de eucalipto geraram sobrenadantes e, conseqüentemente, *pellets* com muita oxidação.

Todas as amostras de DNA extraídas com esse protocolo foram testadas em reações de PCR com sucesso. Amostras de folha e câmbio de eucalipto também foram utilizadas com sucesso na análise por meio da técnica de AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) (VOS et al., 1995), que envolve digestão com enzimas de restrição e amplificação por PCR, ambos os procedimentos absolutamente dependentes da pureza do DNA.

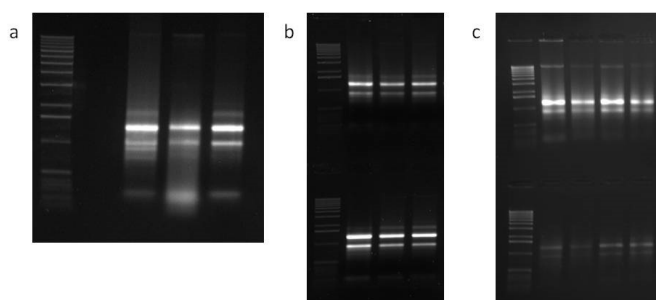


Figura 1. Gel de agarose 1% em tampão TAE para avaliação da integridade de RNA total extraído com protocolo CTAB e pré-lavagem com tampão sorbitol. Amostras de RNA de folha, fruto e câmbio de *Eucalyptus grandis* (a); amostras de RNA de tecido foliar (pente superior) e câmbio (pente inferior) de três árvores de *Eucalyptus grandis* (b); duas amostras de tecido foliar, duas de flor (pente superior), duas amostras de pseudofruto, fruto e embrião (pente inferior) de caju. O primeiro canal de todos os géis mostra o marcador 1 Kb ladder.

Tabela 1. Dados de espectrofotometria obtidos em Nanodrop 2000 a partir de extrações de DNA utilizando-se o protocolo com pré-lavagem com tampão sorbitol.

Espécie (Família)	Tecido	Número de amostras	Concentração média (ng/μL)	Razão 260/280 média	Razão 260/230 média
<i>Eucalyptus</i> spp. (Myrtaceae)	Folha	185	359	2,02	2,40
<i>Eucalyptus</i> spp. (Myrtaceae)	Câmbio	36	137	2,06	1,52
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Folha	1222	515	1,96	2,05
<i>Pereskia aculeata</i> (Cactaceae)	Folha	92	236	2,11	2,31
<i>Manihot esculenta</i> (Euphorbiaceae)	Folha	238	2141	1,99	2,00
<i>Arachis</i> spp. (Fabaceae)	Folha	92	540	2,06	2,24
<i>Trichoderma</i> spp. (Hypocreaceae – Fungi)	Micélio	58	1461	2,05	2,17

Tabela 2. Dados de espectrofotometria obtidos em Nanodrop 2000 a partir de extrações de RNA utilizando-se o protocolo com pré-lavagem com tampão sorbitol.

Espécie (Família)	Tecido	Número de amostras	Concentração média (ng/μL)	Razão 260/280 média	Razão 260/230 média
<i>Eucalyptus grandis</i> (Myrtaceae)	Folha	6	1.540	2,16	2,34
<i>Eucalyptus grandis</i> (Myrtaceae)	Câmbio	3	1.808	1,99	2,43
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Folha	2	680	2,17	2,28
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Flor	2	660	2,135	2,26
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Câmbio	2	207	2,10	2,18
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Fruto	1	114	2,03	2,27
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Pseudofruto	2	131	2,065	2,19
<i>Anacardium occidentale</i> (Anacardiaceae)	Embrião	1	140	2,01	2,36

Conclusões

O protocolo descrito, portanto, mostrou-se eficiente, tanto em termos de rendimento quanto de pureza de DNA, a partir de espécies sabidamente ricas em polissacarídeos e polifenóis, e, assim, apresenta uma alternativa simples e de baixo custo para obtenção de ácidos nucleicos de alta qualidade para diversas aplicações.

Referências Bibliográficas

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113-116, 1993.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19, p. 11-15, 1987.

RUSSELL, A.; SAMUEL, R.; RUPP, B.; BARFUSS, M. H. J.; SAFRAN, M.; BESENDORFER, V.; CHASE, M. W. Phylogenetics and cytology of a pantropical orchid genus *Polystachya* (Polystachyinae, Vandaeae, Orchidaceae): evidence from plastid DNA sequence data. **Taxon**, v. 59, n. 2, p. 389-404, 2010.

SOUZA, H. A.; MULLER, L. A.; BRANDÃO, R. L.; LOVATO, M. B. Isolation of High Quality and Polysaccharide-Free DNA from Leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 756-764, 2012.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

Comunicado Técnico 204

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Endereço: Parque Estação Biológica (PqEB) - Avenida W5
Norte - Caixa Postal 02372 - Brasília, DF, Brasil
CEP: 70770-900
Fone: (61) 3448-4700
Fax: (61) 3340-3624
E-mail: sac@cenargen.embrapa.br
1ª edição
Publicação *online* (2016)

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações

Presidente: Maria Isabela Lourenço Barbirato
Secretário-Executivo: Thales Lima Rocha
Membros: Daniela Aguiar de Souza Kols, Lígia Sardinha Fortes, Lucas Machado de Souza, Márcio Martinello Sanches, Rosameres Rocha Galvão
Membros suplentes: Ana Flávia do Nascimento Dias Côrtes, João Batista Tavares da Silva

Expediente **Normalização bibliográfica:** Ana Flávia do N. Dias Côrtes
Revisão de texto: José Cesamildo Cruz Magalhães
Tratamento das imagens: José Cesamildo Cruz Magalhães
Editoração eletrônica: José Cesamildo Cruz Magalhães