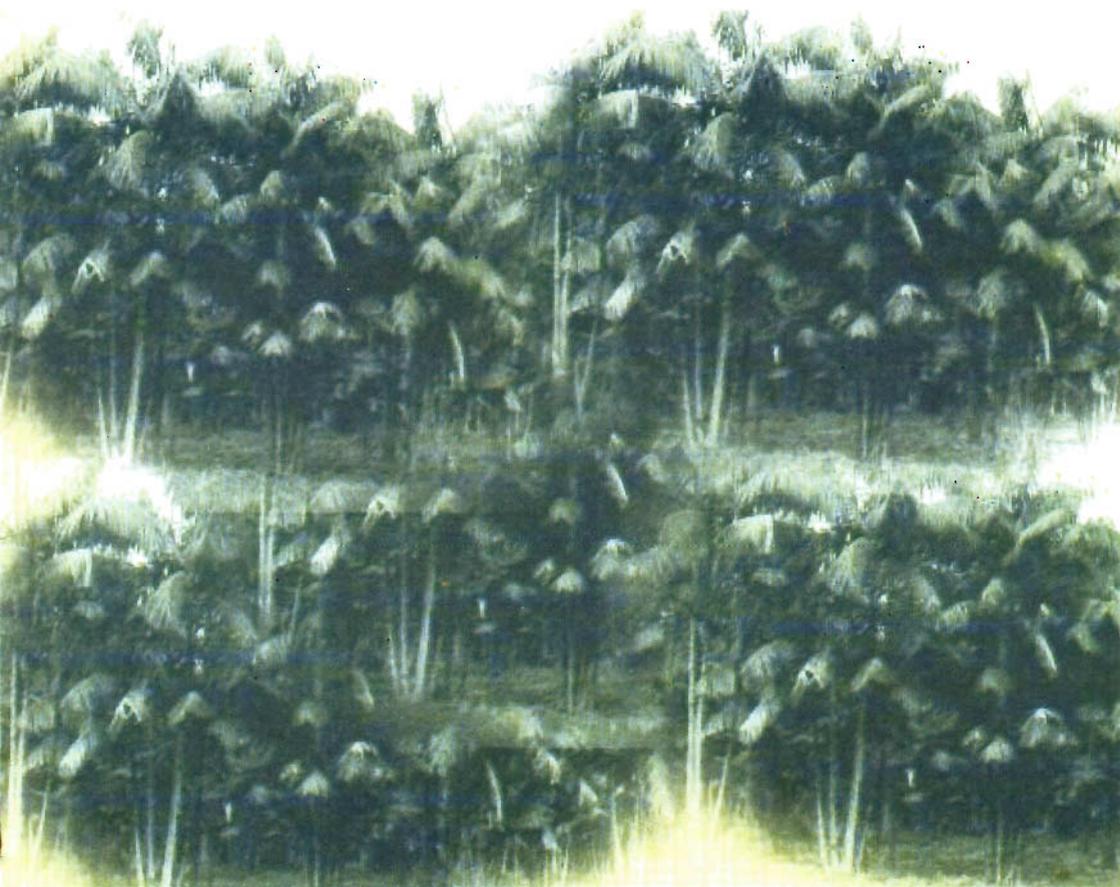


Extração de DNA de Açaizeiro a partir de Folhas





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-2201

Fevereiro, 2002

Documentos 127

Extração de DNA de Açaizeiro a Partir de folhas

Maria Rosa Costa
Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Belém, PA
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Oriental

Trav. Dr. Enéas Pinheiro, s/n
Caixa Postal, 48 CEP: 66095-100 - Belém, PA
Fone: (91) 299-4500
Fax: (91) 276-9845
E-mail: sac@cpatu.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Leopoldo Brito Teixeira*
Secretária-Executiva: *Maria de Nazaré Magalhães dos Santos*
Membros: *Antônio Pedro da Silva Souza Filho*
Expedito Ubirajara Peixoto Galvão
João Tomé de Farias Neto
Joaquim Ivanir Gomes
José de Brito Lourenço Júnior

Revisores Técnicos

Eduardo Romano de Campos Pinto – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Francisco J.L. Aragão – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Osmar Alves Lameira – Embrapa Amazônia Oriental

Supervisor editorial: *Guilherme Leopoldo da Costa Fernandes*

Revisor de texto: *Maria de Nazaré Magalhães dos Santos*

Normalização bibliográfica: *Silvio Leopoldo Lima Costa*

Editoração eletrônica: *Euclides Pereira dos Santos Filho*

1ª edição

1ª impressão (2002): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Costa, Maria Rosa

Extração de DNA de açaizeiro a partir de folhas / Maria Rosa
Costa, Maria do Socorro Padilha de Oliveira - Belém: Embrapa amazônia Oriental,
2002. (Embrapa amazônia Oriental. Documentos, 127).

22p. il. ; 21cm.

ISSN 1517-2201

1. Açaf - Extração de DNA. 2. Genética vegetal. I. Oliveira, Maria do Socorro Padilha de. II. Título. III. Série.

CDD 572.86

Autores

Maria Rosa Costa

Eng. Agrôn., M.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

E-mail: mrco@cpatu.embrapa.br

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Eng. Agrôn., M.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Caixa Postal 48, CEP 66017-970, Belém, PA.

E-mail: spadilha@cpatu.embrapa.br

Agradecimentos

Às estagiárias da Embrapa Amazônia Oriental, Miriã Mutsumi Minato Ohaze e Isabela Guerreiro Diniz, pela contribuição à realização desta pesquisa.

Apresentação

As técnicas de biologia molecular que permitem acessar e avaliar o genótipo e a variabilidade a nível de DNA tem despertado o interesse de melhoristas de plantas do mundo inteiro. Para que se obtenha êxito no uso destas tecnologias e que se aprecie as suas vantagens, um dos fatores essenciais é a obtenção de DNA de boa qualidade, livre de impurezas e com a maior integridade possível. Com isso em mente, elaborou-se este trabalho, visando disponibilizar informações a respeito de uma metodologia adequada à extração de DNA de açaizeiro que foi otimizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular da Embrapa Amazônia Oriental - LABGEN, além de orientar passo a passo, o uso da mesma. Trata-se de uma abordagem didática a qual o leitor deve considerar como uma introdução ao assunto.

Este trabalho está subdividido em tópicos relativos à extração, quantificação e diluição de DNA obtido a partir de folhas de açaizeiro.

Esperamos que os leitores aproveitem este material, informando os erros que possam ser encontrados, para que possamos corrigí-los.

Emanuel Adilson Souza Serrão

Chefe Geral da Embrapa Amazônia Oriental

Sumário

Extração de DNA de açazeiro a partir de folhas	11
Introdução	11
Desenvolvimento da Técnica	12
Resultados Obtidos	15
Conclusão	17
Referências Bibliográficas.....	17
Anexo	19

Extração de DNA de açazeiro a partir de folhas

Maria Rosa Costa

Maria do Socorro Padilha de Oliveira

Introdução

O DNA (ácido desoxirribonucléico) está presente em três organelas da célula vegetal: cloroplasto, mitocôndria e núcleo. O genoma nuclear é o maior deles, tanto em termos de quantidade de DNA como em número de genes codificados. Para a utilização do DNA em estudos de polimorfismo genético (marcadores moleculares), a extração do DNA genômico total é recomendável e eficiente, embora existam métodos capazes de isolar os tipos distintos de DNA (Bered, 1998).

Ao se utilizar técnicas moleculares na caracterização de recursos genéticos vegetais deve-se levar em conta a qualidade e integridade do DNA que são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores. A concentração adequada de DNA a ser utilizada pode variar conforme o organismo a ser estudado, dependendo do tamanho do genoma. O DNA em excesso na reação de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), por exemplo, pode resultar na falha completa da reação devido à alta concentração de impurezas agregadas ou perfis eletroforéticos com arraste e bandas pouco definidas. Por outro lado, a baixa concentração de DNA resulta em amplificação errada ou não amplificação de certos segmentos com perfis de eletroforese não reproduzíveis (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Neste aspecto é fundamental proceder a quantificação e qualificação do DNA obtido visando a diluição para a concentração exigida na técnica que será utilizada posteriormente.

Existem diferentes protocolos de extração de DNA que variam em função da espécie e do tecido a ser utilizado. Vale ressaltar que a maneira de coletar e acondicionar o tecido, assim como o estado vegetativo do mesmo são fundamentais para o sucesso da extração.

Normalmente submete-se o tecido vegetal a uma solução extratora cuja composição varia de acordo com o protocolo utilizado, sendo que cada solução deve conter um tampão para estabilizar o pH, um sal para dissociar as proteínas, um detergente para solubilizar as membranas e um agente inativante das DNAses, cuja função é proteger o DNA genômico.

Esta metodologia para extração de DNA foi realizada no Laboratório de Genética e Biologia Molecular - LABGEN da Embrapa Amazônia Oriental, tendo como base o protocolo de Nelson (1993), com modificações e ajustes para otimizá-lo para o açaizeiro (*Euterpe oleraceae* Mart.).

Desenvolvimento da Técnica

Durante o processo de extração de DNA de açaizeiro, alguns aspectos devem ser levados em consideração: (1) O material deve ser oriundo de folhas em bom estado vegetativo, isento de danos por pragas ou doenças. Para a coleta do material existem dois procedimentos. No caso de haver possibilidade de extrair o DNA logo após a coleta deve-se manter o material em isopor com gelo e recomenda-se promover a extração com maior brevidade possível. Antes de iniciar o processo deve-se promover a limpeza e desinfecção do tecido em água corrente e solução de hipoclorito de sódio (10 %); (2) Deve-se utilizar nitrogênio líquido durante a maceração do tecido visando o rompimento das células com maior facilidade já que o açaizeiro possui folhas bastante fibrosas e de difícil maceração; (3) A quantidade de tecido moído a ser utilizada varia em função da quantidade de DNA que se deseja obter, ou seja, pode-se moer cerca de 150 mg de tecido e realizar a extração em tubos eppendorf de 1,5 ml, colocando 700 ul de solução extratora. ou utilizar cerca de 500 mg e promover a extração em tubos de prolipropileno de 15 ml, com 3ml de solução extratora. No caso de desejar-se guardar o material para realizar a extração de DNA após um período de acondicionamento, deve-se coletar o material e guardá-lo em sacos identificados, com sílica, na proporção de 50 g para 3 a 5 g de tecido vegetal. Após um período de aproximadamente 24 horas, quando o tecido estiver seco, retirar o excesso de sílica deixando em torno de 2 g.

O processo de extração consiste em transferir o tecido vegetal macerado para tubos identificados e submetê-lo a uma solução extratora previamente aquecida (65 °C) (Fig. 1).

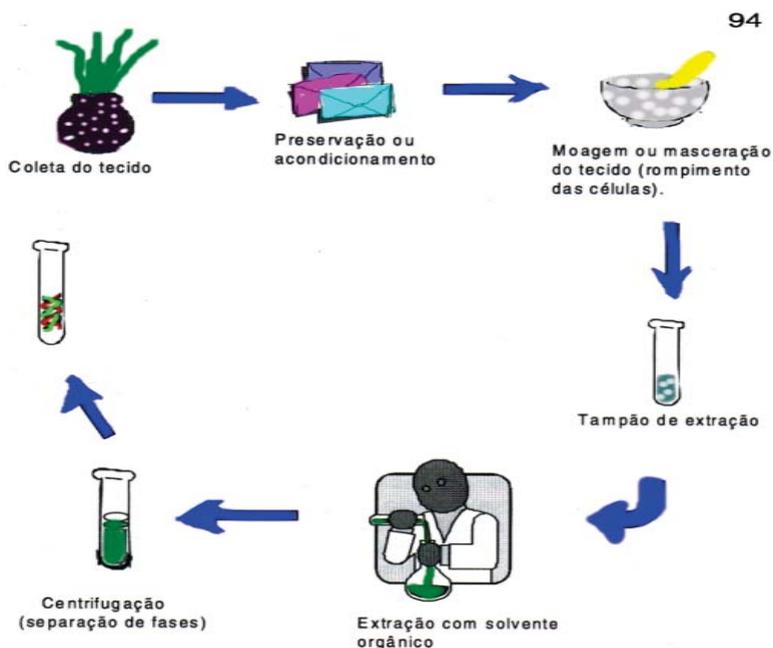


Fig. 1. Esquema de extração de DNA.

Fonte: Bered (1998), adaptado pela autora.

Procedimento

- Congelar previamente cadinho e pistilo de porcelana e demais utensílios;
- Cortar as folhas com tesoura ou vazador evitando sempre as nervuras;
- Macerar em almofariz com nitrogênio líquido. Esta etapa não deve ser demorada, para evitar oxidação do material;
- Transferir o material para tubos identificados;

- Acrescentar a solução extratora completa (Anexo), utilizando 700 µl para tubos de 1,5 ml ou 3 ml para tubos de 15 ml;
- Agitar levemente;
- Levar para banho-maria a 60°C, durante 20 a 60 minutos. Agitando de 10 em 10 minutos;
- Retirar do banho-maria e acrescentar um solvente orgânico como clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), utilizando 700 µl para tubos de 1,5 ml ou 3 ml para tubos de 15 ml, para que haja a extração propriamente dita. Agitar fortemente para formar uma emulsão;
- Centrifugar durante 10 minutos (4 °C 12.000 rpm em centrífuga M R 18.22 JOUAN);
 - Transferir o sobrenadante para um novo tubo e acrescentar igual volume de etanol 95 %. Esta etapa deve ser cuidadosa evitando-se resíduos vegetais o que dificultará a obtenção de DNA com alto grau de pureza;
 - Agitar invertendo os tubos gentilmente para precipitar o DNA e permitir a sua visualização;
 - Centrifugar durante 10 minutos (4 °C e 12.000 rpm em centrífuga M R 18.22 JOUAN);
 - Retirar o etanol 95 % e acrescentar 1 ml de etanol 70 % para remover sais.
 - Centrifugar durante 10 minutos (4 °C e 12.000 rpm em centrífuga M R 18.22 JOUAN);
 - Verificar se há ocorrência de impurezas (resíduo vegetal e outras). Se houver, repetir a lavagem com etanol 70 %;
 - Retirar o etanol e deixar secando a temperatura ambiente, por um período aproximado de doze horas;
 - Ressuspender o DNA com TE (anexo) contendo RNAse (10 µg.ml⁻¹). A quantidade de RNAse varia em função do tamanho do precipitado observado. Deixar na estufa a 37 °C durante cerca de uma hora até a completa ressuspensão do precipitado. Deve-se mexer no tubo levemente de dez em dez minutos para facilitar a dissolução;
 - Guardar a 4 °C (geladeira) até a quantificação.

Resultados Obtidos

Através da metodologia acima descrita têm-se obtido DNA de boa qualidade isento de impurezas (Fig. 2) e em quantidades variáveis, porém bastante concentrado (Tabela 1). Assim após a qualificação e quantificação do mesmo por análise comparativa em gel de agarose, torna-se necessário diluí-lo para uma concentração adequada (5 ng/ μ l) para utilização na técnica de RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) (Fig. 3). Na Fig. 4 observa-se um exemplo de RAPD utilizando DNA de boa qualidade que originou perfis eletroforéticos com bandas bem definidas e de fácil visualização.



Fig. 2. DNA genômico com presença de RNA (sem utilização de RNase).

Tabela 1. Exemplo das concentrações médias de DNA genômico de açaizeiro obtidas.

Acessos	Quantidade de DNA por amostra (ng/ μ l)
006	313
042	300
067	200
050	40
064	50
072	100
090	200
127	60
135	40

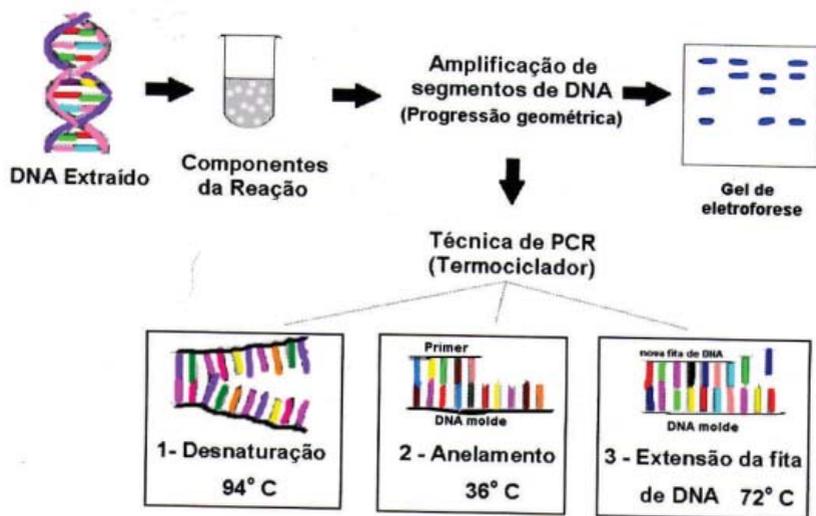


Fig. 3. Esquema de RAPD (adaptado de Cruz et al., 1998).
 Fonte: Cruz et al. (1998), adaptado pela autora.



Fig. 4. Exemplo de ensaio RAPD de dez indivíduos de *E. oleracea* utilizando DNA de boa qualidade.

Exemplo de diluição do DNA genômico:

Após a quantificação do DNA, a diluição deve ser calculada pela fórmula $C.V = C_1.V_1$, onde:

C = é a concentração lida de DNA total (em ng/μl);

V = é o volume a ser pipetado do DNA total concentrado (em μl);

C_1 = é a concentração de trabalho correspondente a 5 ng/μl;

V_1 = é o volume final correspondente a 500 μl.

Exemplo da diluição do DNA genômico de açaizeiro do acesso 006:

$$C.V = C_1.V_1$$

$$313 \text{ ng}/\mu\text{l}.V = 5 \text{ ng}/\mu\text{l}.500 \mu\text{l}$$

$$V = \frac{5 \cdot 500}{313}$$

$$V = 8 \mu\text{l de DNA}$$

Deve-se completar o volume de 500 μl com 492 μl de água estéril.

Conclusão

A metodologia acima descrita foi eficiente na extração de DNA de açaizeiro a partir de folhas recém coletadas e também acondicionadas em sílica. Devem ser seguidos cuidadosamente os passos descritos já que alterações não metodológicas poderão influenciar na quantidade e natureza do DNA obtido.

Referências Bibliográficas

BERED, F. Extração de DNA – considerações e prática. In: MILACH, S.C.K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.91-97.

CRUZ, R.P. da; MILACH, S.C.K. Análise de RAPD. In: MILACH, S.C.K. (Ed.) **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. p.107-116.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares na análise genética**. 3. ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1998. 220p.

NELSON, J. C. ITMI **Wheat mapping workshop – laboratory manual**. Ithaca: Cornell University, 1993.

Anexo

Solução Extratora de DNA

1- Brometo de etídio (10 mg/ml)

Adicionar 1 g de brometo de etídio a 100 ml de água estéril. Agitar vigorosamente em agitador magnético por várias horas, até ter certeza de que o corante esteja dissolvido. Armazenar a temperatura ambiente em recipiente de cor escura ou envolvê-la em folha de papel alumínio.

Obs: o brometo de etídio é um poderoso mutagênico e moderadamente tóxico. Durante a manipulação deste produto é recomendável o uso de luvas e máscaras. Após o uso deste produto todos os recipientes devem ser descontaminados utilizando-se métodos apropriados.

2- Azul de bromofenol (Bromophenol blue) – Tampão de amostra

Adicionar 0,042 g de azul de bromofenol a 7,0 ml de TAE 1x (490 ml de água estéril e 10 ml de TAE 5x) e 3 ml de glicerol. Estocar à temperatura ambiente

3- Clorofórmio:Álcool Isoamílico (24:1)

Juntar 24 partes de clorofórmio a uma parte de álcool isoamílico.

4- Componente da solução extratora -CTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio) 20%

Adicionar 20 g de CTAB a 80 ml de água estéril. Aquecer até 60-80 °C para facilitar a dissolução. Ajustar o volume para 100 ml com água estéril. Não é necessário esterilizar. Armazenar a temperatura ambiente.

5- DNA Padrão para quantificar DNA (DNA Lambda)

Diluir o DNA pela seguinte fórmula: $C \cdot V = C_1 \cdot V_1$

Exemplo: C = concentração estoque 450ng/μl

Então: $450\text{ng}/\mu\text{l} \cdot V = 10\text{ng}/\mu\text{l} \cdot 500\mu\text{l}$

$V = 10\mu\text{l}$ de DNA Lambda $450\text{ng}/\mu\text{l}$

6- Proteínase K – $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ – Estoque – $20\ \text{mg}/\text{ml}$ (Verificar concentração na embalagem)

A quantidade de tampão a ser usada na diluição é obtida pela fórmula: $(T \times \text{CFP})/(\text{CIP} \times 10^3)$. Onde:

$T =$ Volume do tampão a ser usado (N° amostras $\times 700 + 10\%$)

$\text{CFP} =$ Concentração final da proteinase ($50\ \mu\text{g}/\text{ml}$)

$\text{CIP} =$ Concentração inicial da proteinase ($20\ \text{mg}/\text{l}$)

7- Ribonuclease A $10\ \text{mg}/\text{ml}$ – (Solução estoque)

Dissolver $10\ \text{mg}$ de RNase A em $1,0\ \text{ml}$ de acetato de sódio $0,01\ \text{M}$ ($\text{pH}\ 5,2$). Ajustar o pH para $7,4$ adicionando Tris HCl $1\ \text{M}$ $\text{pH}\ 8,0$ (TE). Aquecer até $100\ ^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Deixar esfriar lentamente à temperatura ambiente. Dividir em alíquotas e armazenar a $-20\ ^\circ\text{C}$.

8- Ribonuclease A $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ em tampão TE

Juntar $10\ \mu\text{l}$ de TE (Tris HCl $1\ \text{M}$ $\text{pH}\ 8,0$, $2\ \mu\text{l}$ de EDTA $0,5\ \text{M}$ $\text{pH}\ 8,0$), $1\ \mu\text{l}$ de RNase ($10\ \text{mg}/\text{ml}$) e $987\ \mu\text{l}$ de água estéril. Armazenar a $4\ ^\circ\text{C}$.

9- Solução de EDTA $0,5\ \text{M}$ ($\text{pH}\ 8,0$)

Adicionar $186,1\ \text{g}$ de dissodium ethylenediaminetetra-acetate $2\text{H}_2\text{O}$ (EDTA) a $800\ \text{ml}$ de água estéril. Agitar vigorosamente em agitador magnético. Mantendo a solução sobre o agitador magnético, ajustar o pH para $8,0$ com a adição de NaOH (aproximadamente $20\ \text{g}$ de NaOH peletizado). O sal dissódico EDTA não dissolve enquanto o pH da solução não se aproximar de $8,0$. Dividir o volume em vasilhames de $250\ \text{ml}$, esterilizar por autoclavagem e armazenar a $4\ ^\circ\text{C}$.

10- Solução de NaCl 5M

Dissolver 292,2 g de NaCl em 800 ml de água estéril. Ajustar o volume para 1 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml, esterilizar através de autoclavagem e armazenar a 4 °C.

11- Solução de Tris 1 M

Dissolver 121,1 g de Tris base em 800 ml de água estéril. Ajustar o pH para 8,0 adicionando aos poucos aproximadamente 42 ml de HCl concentrado. Aguardar a solução esfriar até a temperatura ambiente antes de fazer o ajuste final do pH. Ajustar o volume da solução para 1,0 litro com água estéril. Dividir o volume em vasilhames de 250 ml e esterilizar por autoclavagem. Armazenar à temperatura ambiente.

Ao final, se a solução apresentar-se com coloração amarelada, deve-se descartar e obter Tris de melhor qualidade.

12 - Tampão de Extração

Juntar 10 ml de CTAB 20 %, 28 ml de NaCl 5 M, 4 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0, 10 ml de Tris 1 M pH 8,0 e 1,0 g de PVP40 e completar com água esterilizada. Adicionar 200 µl de mercaptoetanol (2 µl/ml) e proteinase K (2 µl/ml).

13- TE pH 8,0

Juntar 1,0 ml de Tris HCl 1M em pH8,0 (10mM), 0,2 ml de EDTA 0,5M em pH8,0 (1mM), completar com água estéril e armazenar à temperatura ambiente.

14- Tampão Tris-acetato - (TAE5x)

Juntar 242,0 g de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial e 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0). Completa-se o volume para 1 litro com água esterilizada.

15- Tampão Tris-acetato - (TAE 1x)

Diluir 200 ml de TAE (5X) em 800 ml de água esterilizada.

16- Tampão Tris-bórico 5X - (TBE 5x)

Juntar 54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico e 20 ml de EDTA 0,5M (pH 8,0). Completa-se o volume para 1 litro com água esterilizada.

17- Tampão Tris-bórico 1X - (TBE1x)

Diluir 200 ml de TBE (5X) em 800 ml de água esterilizada.

Embrapa

Amazônia Oriental

CGPE 3104

Patrocínio:



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA,
PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

Governo do
BRASIL