

87

Circular Técnica

Porto Velho, RO
Setembro, 2006

Autores

Ana Karina Dias Salman

Zootecnista, D.Sc., Embrapa
Rondônia, Caixa Postal 406, CEP
78900-970, Porto Velho, RO.,
aksalman@cpafro.embrapa.br

Monyka Marianna Mussolini Laureano

Zootecnista, M.Sc.,
monyka_zoo@yahoo.com.br

Protocolos para extração de DNA genômico de amostras de pêlo de bovinos

Introdução

Atualmente, amostras de DNA genômico extraído de animais de interesse zootécnico, em especial bovinos, podem ser utilizadas para vários fins, como por exemplo, diagnóstico clínico de doenças, teste de paternidade para registro genealógico, determinação de distância genética entre animais para planejamento de cruzamentos e estimativa de valor genético de animais elite.

Além dessas aplicações, na área da genética animal o advento das técnicas de biologia molecular possibilitou o desenvolvimento de estudos de variabilidade genética ao nível de DNA dentro de populações. Diversas técnicas estão descritas na literatura para a detecção da variabilidade genética ao nível de polimorfismos na seqüência do DNA, como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), minisatélites e microsatélites. Essas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo ou regiões de genes envolvidos com a manifestação de características de interesse econômico.

No entanto, a aplicabilidade dessas técnicas requer uma quantidade suficiente de DNA de boa qualidade, o que é particularmente problemático no caso de animais utilizados com interesse comercial já que a coleta de amostras para a extração do DNA não deve interferir na rotina da propriedade, logo não deve ser trabalhosa, onerosa e nem deve estressar os animais. Por esse motivo deve-se dar preferência às técnicas menos invasivas que a coleta de sangue, como por exemplo, a obtenção de pêlos para extração de DNA das células do bulbo capilar. Nesses casos, no entanto, devido ao pouco número de células e ao excesso de moléculas contaminantes é necessário utilizar metodologias específicas para otimizar a extração de DNA de boa qualidade para a utilização na reação da polimerização em cadeia (PCR).

A obtenção do DNA genômico pelos métodos convencionais inclui lise celular e procedimentos que tornam o DNA disponível para a extração. Para isso, vários são os passos laboratoriais necessários que tornam o procedimento longo e cansativo. Dependendo da situação, o rendimento e a pureza do material extraído nem sempre é adequado ou apresenta-se em concentrações viáveis para a sua utilização em protocolos de amplificação por PCR. Além disso, a excessiva manipulação da amostra pode degradar o DNA em vários níveis.

Na literatura existem algumas técnicas descritas com essa finalidade, utilizando substâncias e estratégias diferentes. Os métodos mais freqüentemente utilizados para extração de DNA genômico iniciam-se com a liberação dos ácidos nucléicos, o que envolve a lise das células seguida de ataques enzimáticos e/ou químicos para destruir os componentes protéicos do meio. Após a proteólise, faz-se a purificação do DNA utilizando solventes orgânicos e a precipitação com etanol.

Descrever uma experiência de padronização de protocolo de extração de DNA de células do bulbo capilar de pêlos coletados da vassoura da cauda de bovinos visando a utilização em análises por PCR.

Coleta das amostras de pêlo

As amostras de pêlos foram retiradas das vassouras das caudas de 300 fêmeas Nelore pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético da Fazenda Jacarezinho, situada na cidade de Valparaíso, SP. Durante o manejo sanitário do rebanho, os pêlos foram retirados com o auxílio de um alicate cortando-se o excesso de pêlo com uma tesoura limpa sobre uma folha de alumínio. Os folículos foram devidamente armazenados em freezer a -20°C , para posterior extração do DNA.

As amostragens dos pêlos também podem ser realizadas durante uma pesagem ou qualquer outro

procedimento em que os animais são levados ao tronco de contenção com o intuito de interferir o mínimo possível no manejo da fazenda e evitar o estresse excessivo dos animais. Os pêlos da vassoura da cauda do animal podem ser retirados laçando-se entre 15 e 25 pêlos nos dedos da mão e puxando-os com firmeza (Fig. 1). É importante que os pêlos estejam secos e limpos por ocasião da coleta. Após a coleta, deve-se verificar se os pêlos apresentam os bulbos intactos, ou seja, se eles não foram quebrados antes da raiz. O excesso de pêlo deve ser cortado deixando num comprimento de aproximadamente 5 cm. Os folículos podem ser colocados em microtubos estéreis (Fig. 2) para o armazenamento em freezer a -20°C até o momento da extração do DNA.



Fig. 1. Coleta de amostras de pêlos da vassoura da cauda de bovinos.



Fig. 2. Armazenamento das amostras de folículos em microtubos estéreis.

Protocolos para extração do DNA genômico

Os procedimentos para extração do DNA genômico foram realizados no Laboratório de Genética de Bactérias do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias da UNESP, campus de Jaboticabal (SP). Com o intuito de verificar qual procedimento resultaria em amostras de DNA livres de contaminações e com quantidade satisfatória para a realização das análises de amplificação de fragmentos

de DNA por PCR, três protocolos foram testados, os quais são descritos a seguir:

Protocolo 1 (LIMA, 2003)

1. Colocar em um tubo estéril de microcentrifuga (1,5 mL) cerca de 40 folículos por animal e centrifugar rapidamente.
2. Adicionar 500 μL de solução TE-TWEEN (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada amostra.

3. Incubar em banho-maria a 65°C por 1-2 horas com agitação periódica.
 4. Adicionar de 10-20 µL de proteinase K por tubo para concentração final de aproximadamente 0,7-1,4 µg de proteinase K/µL.
 5. Incubar a 55°C por 6-12 horas com agitação periódica.
 6. Incubar a 37°C por uma noite.
 7. Adicionar 1 vol de solução PCI (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) para 1 vol de amostra.
 8. Agitar vigorosamente os tubos por 10 segundos em agitador automático.
 9. Centrifugar por 10 minutos.
 10. Transferir o sobrenadante para um tubo estéril de microcentrífuga (2 mL).
 11. Precipitar o DNA com acetato de sódio 0,3 M na quantidade relativa à 1/10 do volume da amostra e aproximadamente 1 mL de etanol gelado.
 12. Misturar por inversão os tubos e colocá-los no gelo seco por 5 minutos ou mais (ou no freezer -70°C por 1 a 2 horas).
 13. Centrifugar a 4°C por 20 a 30 minutos a 12.000 rpm.
 14. Descartar o sobrenadante e secar o DNA em temperatura ambiente.
 15. Armazenar a amostra de DNA em 50 µL de água deionizada.
2. Adicionar 1mL de tampão de extração (20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl e 2% (v/v) de brometo de cetiltrimetilamônio-CTAB) e 0,2% de β-mercaptoetanol.
 3. Agitar e transferir para um tubo de microcentrífuga de 2 mL.
 4. Incubar em banho-maria a 60°C por 25 minutos e depois resfriar em temperatura ambiente.
 5. Adicionar 1 mL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e agitar vigorosamente em agitador mecânico por aproximadamente 3 minutos.
 6. Centrifugar a 10.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
 7. Transferir o sobrenadante para um tubo estéril de microcentrífuga.
 8. Adicionar 0,5 volume de NaCl 5 M (500 µL) para 1,0 volume de etanol gelado (-20°C) 95%.
 9. Armazenar a -80°C por 20 minutos para total precipitação do DNA.
 10. Centrifugar a 6.000 rpm por 5 minutos e a 10000 rpm por mais 5 minutos a 4°C para formação do precipitado.
 11. Descartar o sobrenadante e “lavar” o precipitado com etanol 70% gelado (4°C).
 12. Secar o DNA precipitado em temperatura ambiente e ressuspender com 50 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) tratado com 10 µL de RNase na concentração de 10 mg/mL.
 13. Incubar em banho-maria a 37°C por 20 minutos.
 14. Armazenar as amostras de DNA a -20°C.

Algumas modificações foram realizadas nesse protocolo com o intuito de aumentar a quantidade de DNA extraído por amostra e para reduzir a contaminação do DNA genômico por fenol. As alterações foram:

1. No passo 4 a quantidade de proteinase K por amostra foi aumentada para uma concentração final de 2,4 µg proteinase K/µL de amostra.
2. No passo 12 a precipitação do DNA foi à -80°C por 40-50 minutos.
3. No passo 13 a temperatura da centrifugação foi alterada para 23°C.

Protocolo 2 (LODHI et al.,1994 apud COSTA, 2003)

1. Macerar em nitrogênio líquido com a ajuda de um almofariz e um pistilo de porcelana 40 folículos/animal.

Protocolo 3 (GRAFFY, FORAN, 2005)

1. Cortar 5 folículos/animal com aproximadamente 5 cm dos pêlos e colocá-los em microtubo estéril de 1,5 mL.
2. Acrescentar 50 µL de solução de lise (NaOH 200 mM).
3. Agitar vigorosamente em agitador mecânico.
4. Centrifugar a 13.000 rpm por 10 segundos.
5. Recuperar o sobrenadante (40 µL aproximadamente) e transferi-lo para um microtubo estéril de 1,5 mL.
6. Incubar a 95°C por 10 minutos.
7. Adicionar 50µL de solução neutralizadora (HCl 200 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8,5) e homogeneizar.
8. Conservar as amostras a -20°C.

Avaliação das amostras de DNA

Para verificar qual o método mais adequado para as condições e objetivos do nosso estudo, as amostras de DNA obtidas por meio dos protocolos descritos anteriormente foram avaliadas por espectrofotometria para determinar a quantidade de DNA e a presença de contaminantes protéicos na amostra. A integridade do DNA e a contaminação por RNA foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose.

Além das avaliações quantitativas e qualitativas, as amostras de DNA obtidas pelos protocolos descritos anteriormente foram utilizadas em reações de PCR para a amplificação de fragmentos dos genes do IGF-I e da prolactina bovinos. Dessa forma foi possível verificar se as amostras de DNA eram viáveis para a obtenção de produtos amplificados em quantidade e qualidade adequadas para estudos de verificação de polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) e de conformação de cadeia simples (SSCP).

Quantificação do DNA genômico

Alíquotas de 2 µL de DNA foram diluídas em 98 µL de água estéril ultrapura para a quantificação das amostras de DNA em espectrofotômetro Beckman-DU®. A partir desta quantificação, as amostras foram diluídas em tampão TE (100 mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM de EDTA pH 8,0) na concentração de 100 ng/µL e estocadas a -20° C.

Como proteínas e ácidos nucleicos absorvem radiações aos 260 e 280 nm, respectivamente, a razão entre leituras de absorbâncias a 260 e 280 nm permite estimar a contaminação da amostra de DNA com proteína.

Para a análise da integridade do DNA extraído foram feitas corridas eletroforéticas em géis de agarose a 0,8% e tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3) contendo brometo de etídio (0,05 µg/mL), aplicando-se 2 µL de DNA genômico diluídos em 3 µL de tampão de corrida (Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%) durante, aproximadamente, 2h em tensão de 48V. As bandas visualizadas nos géis foram fotodocumentadas em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad).

Amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

As seqüências de bases nucleotídicas dos dois pares de iniciadores utilizados para amplificação do fragmento do gene do IGF-I e da PRL bovino encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Seqüência dos pares de iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos dos genes IGF-I e prolactina (PRL).

Par de iniciadores	Seqüência de bases
IGF-I <i>forward</i>	5' – ATTACAAACCTGCCTGCCCC – 3'
IGF-I <i>reverse</i>	5' – ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT – 3'
PRL <i>forward</i>	5' – ATGATTTTTGGTGGCCCTAG – 3'
PRL <i>reverse</i>	5' – TGAGCAGGAGATGGAGAG – 3'

As regiões do gene da prolactina e do IGF-I foram amplificadas por PCR em reações contendo 100 ng de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, tampão PCR 1X [10 mM Tris-HCl (pH 9,0) e 50 mM KCl], 1,5 mM MgCl₂, 100 µM de dNTPs e 0,5 U de *Taq* polimerase para um volume final de 25 µL.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador MJ Research PTC-100 de acordo com a seguinte programação:

- Para o iniciador IGF-I foi utilizada a técnica do *touchdown* (Tabela 2), que consiste na elevação da temperatura de associação do iniciador em 10°C no primeiro ciclo com subsequente redução de 1°C a cada ciclo até atingir a temperatura ideal de associação do iniciador, de onde foi continuada a reação de PCR.

Tabela 2. Condições da reação de PCR para o iniciador do gene do IGF-I.

Gene	Reação de PCR (<i>Touchdown</i>)			
	1ª Etapa (10 ciclos)		2ª Etapa (35 ciclos)	
	T (°C)	Tempo	T (°C)	Tempo
IGF-I	94	1'	94	1'
	66(↓1°C/ciclo)	30''	56	30''
	72	1'	72	1'

T = Temperatura.

A confirmação das amplificações das amostras foi feita por corridas eletroforéticas em géis de agarose a 1,5% em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e ácido bórico 89 mM, pH 8,3) com brometo de etídio (0,05 µg/mL), aplicando-se 4 µL de cada produto amplificado e 3 µL de tampão de corrida (Tris-HCl 0,1M, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%) durante, aproximadamente, 1,5 horas em tensão de 100V. Os géis foram fotodocumentados em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad).

Dentre os métodos testados para a extração do DNA genômico, o protocolo 1 proposto por Lima (2003) adaptado, apesar de mostrar-se mais laborioso e caro quando comparado aos outros dois foi o que proporcionou a extração de um DNA genômico com os parâmetros desejados. O grau de pureza do DNA, determinado por leitura em espectrofotômetro, apresentou razão de leituras de absorbância (A260/A280) próxima de 1,80, indicando um material

de alta qualidade com baixa contaminação por proteína, e a concentração média de DNA obtido foi de 753 ng/ μ L.

A baixa contaminação por proteína nas amostras de DNA extraídas pelo protocolo 1 está relacionada ao fato desse método utilizar a proteinase K e a solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (PCI). A proteinase K é uma protease endolítica que cliva as ligações peptídicas adjacentes ao grupo carboxílico de aminoácidos alifáticos, hidrofóbicos ou aromáticos. Enquanto a solução PCI é eficiente na purificação de ácidos nucleicos porque o fenol é um forte desnaturador de proteínas e facilita a remoção destas dos extratos celulares, tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos; o clorofórmio, além de ser um desnaturador de proteínas, possui também a propriedade de estabilizar a interface celular, reduzindo a quantidade da fase aquosa retida na fase orgânica, aumentando desta maneira a densidade das misturas e facilitando a remoção de lipídios e contaminantes protéicos presentes na fase orgânica, deixando somente os ácidos nucleicos na fase aquosa. O álcool isoamílico quando misturado ao fenol:clorofórmio previne a formação de espuma na solução durante a agitação vigorosa, além de reter proteínas desnaturadas na interface e melhorar a separação das fases.

A integridade do DNA extraído pelo protocolo 1 foi avaliada na eletroforese em gel de agarose 0,8% (Fig. 3), a qual demonstrou que as amostras permaneceram

íntegras sem quaisquer sinais de degradação (representado por um arraste no gel). O DNA extraído não foi tratado com RNase, entretanto, as reações de PCR não foram prejudicadas pela presença do RNA.

Em relação aos outros protocolos, a execução do método descrito por Lodhi et al. (1994) citado por Costa (2003) (Protocolo 2) consumiu menos tempo quando comparado ao Protocolo 1, mas resultou em um DNA com sinais de contaminação por proteínas, verificado pela leitura em espectrofotômetro que apresentou razão A260/A280 menor que 1,8 e próxima de 1,40. A presença de proteínas em amostras de DNA genômico destinadas à ampliações de regiões específicas o DNA é indesejável porque interfere na otimização das reações de PCR. Além disso, o baixo rendimento em termos de quantidade final de DNA tornou inviável a sua utilização nesse estudo.

Já o método utilizado pelo Depto. de Genética da ESALQ (comunicação pessoal) mostrou-se muito rápido e simples em relação aos demais, além do menor custo, mas não foi eficiente do ponto de vista técnico já que resultou em uma amostra de DNA de baixa qualidade, com muitas contaminações, as quais foram observadas pela amplificação por PCR de várias bandas inespecíficas. Um outro problema foi a impossibilidade de avaliar a qualidade do DNA em gel de agarose devido à baixa quantidade de DNA extraído.

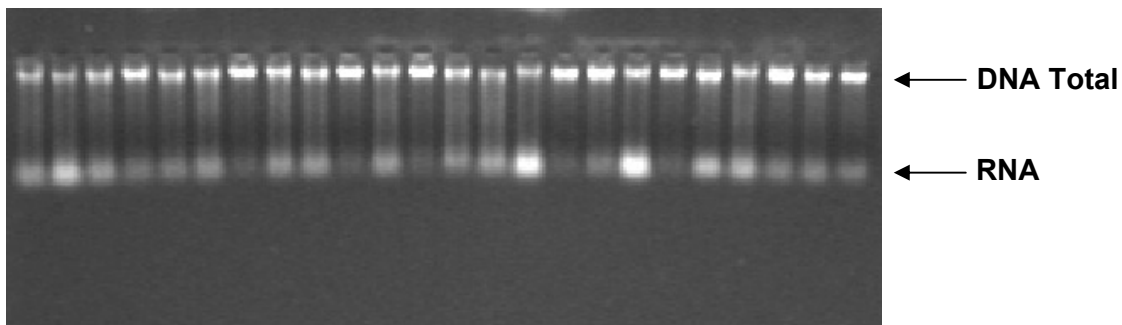


Fig. 3. Gel de agarose 0,8% evidenciando a integridade do DNA extraído pelo Protocolo 1 sem tratamento com RNase.

Reação de amplificação de DNA por PCR

A estratégia *touchdown*, utilizada para a amplificação do fragmento do gene do IGF-1, foi descrita inicialmente por Don et al. (1991). Segundo Moita (2003), esta estratégia melhora a qualidade do produto amplificado, proporcionando diminuição do número de artefatos de bandas formadas pelas reações de PCR, devido à alta temperatura utilizada. O tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 249 pb.

Para a amplificação do fragmento do gene da prolactina foi necessário otimizar a reação de PCR.

Neste processo, a temperatura ideal de anelamento dos iniciadores foi detectada por meio de um gradiente de temperatura e, posteriormente, o número de ciclos foi ajustado para evitar a formação de bandas inespecíficas. Depois de determinadas as condições ideais da reação de PCR, o fragmento do gene da prolactina foi amplificado e apresentou tamanho de aproximadamente 548 pb.

Após o término das reações de PCR, a confirmação das ampliações dos fragmentos foi observada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, como pode ser visualizado nas Figuras 4 e 5 para os genes IGF-1 e prolactina, respectivamente.

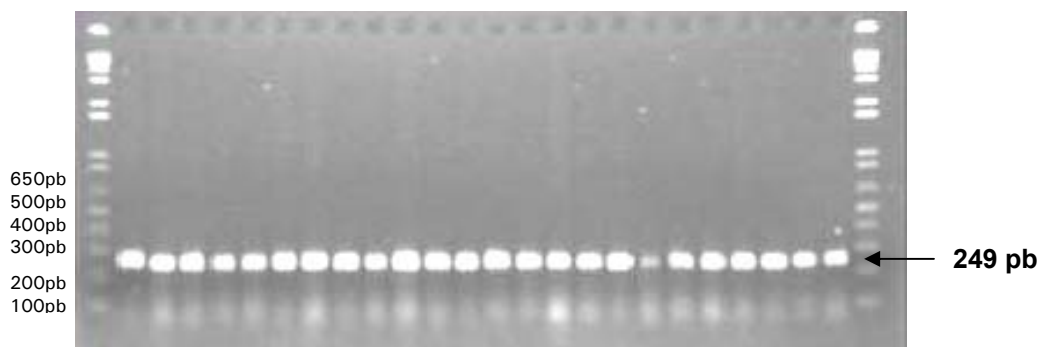


Fig. 4. Gel de agarose 1,5% mostrando o fragmento de 249 pb amplificado por PCR do gene do IGF- I em relação ao marcador 1Kb plus DNA Ladder.

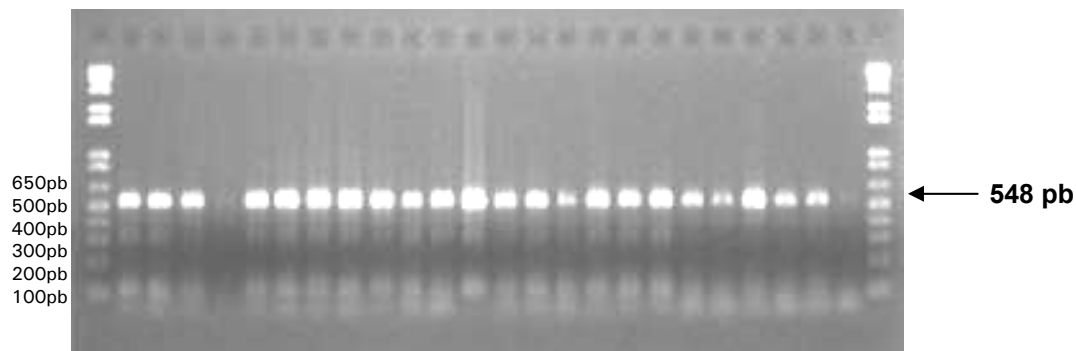


Fig. 5. Gel de agarose 1,5% mostrando o fragmento de 548 pb amplificado por PCR do gene da prolactina em relação ao marcador 1Kb plus DNA Ladder.

Conclusões

O método do fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (Protocolo 1), apesar de bastante laborioso e de utilizar a proteinase K que é um produto caro e o fenol que é de alta periculosidade, foi o que forneceu amostras de DNA genômico em quantidade e qualidade mais adequadas para a utilização em reações de PCR específicas para a amplificação de fragmentos dos genes do IGF-I e da prolactina bovino. Os demais protocolos, apesar de mais rápidos, práticos e econômicos do ponto de vista financeiro, não fornecerem amostras de DNA genômico a partir de células do bulbo capilar com qualidade e quantidade suficiente para a realização das análises do presente estudo.

Referências

COSTA, J. R. V. **Estudo da variabilidade genética em espécies de Jaboticabeiras (*Myrciaria* spp.) com o uso de marcadores moleculares RAPD e marcadores morfológicos.** 2003. 56f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

GRAFFY, E. A.; FORAN, D. R. A Simplified Method for Mitochondrial DNA Extraction from Head Hair Shafts. **Journal of Forensic Science**, v. 50, n. 5, p.1-4, 2005.

LIMA, S. P. G. **Estudo do polimorfismo da região promotora do gene do hormônio de crescimento bovino (bGH), em rebanhos Nelore selecionados para peso pós-desmama.** 2003. 46f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

**Circular
Técnica, 87**

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Rondônia
BR 364 km 5,5, Caixa Postal 406,
CEP 78900-970, Porto velho, RO.
Fone: (69)3901-2510/2521, 3225-9384/9387
Telefax: (69)3222-0409
www.cpafro.embrapa.br

1ª edição

1ª impressão: 2006, tiragem: 100 exemplares

**Comitê de
Publicações**

Presidente: *Flávio de França Souza*
Secretária: *Marly de Souza Medeiros*

Membros: *Abadio Hermes Vieira*
André Rostand Ramalho
Luciana Gatto Brito
Michelliny de Matos Bentes Gama
Vânia beatriz Vasconcelos de Oliveira

Expediente

Normalização: *Daniela Maciel*
Revisão de texto: *Wilma Inês de França Araújo*
Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*