



Protocolo para Extração de RNA de Plantas Nativas do Bioma Cerrado e Amazônico

Maria Cristina Rocha Cordeiro¹
Rodrigo da Rocha Fragoso²
Marília Santos Silva³
Leila Maria Gomes Barros⁴

Introdução

A extração do RNA é o passo fundamental para análises moleculares do transcriptoma tanto por meio de bibliotecas de cDNA, RT-PCR como por RTqPCR. Para tal, é imprescindível o estabelecimento de um protocolo de forma a obter um material com qualidade e em quantidade necessárias para esses estudos.

Plantas nativas do Cerrado ou da Amazônia apresentam muitos compostos fenólicos e polissacarídeos que podem dificultar a obtenção de um material de RNA com qualidade e (ou) quantidade para essas análises moleculares. Produtos comerciais atualmente no mercado algumas vezes não atendem com êxito essa necessidade e, por isso torna-se necessário o estabelecimento de um procedimento eficiente.

O protocolo estabelecido é uma adaptação da metodologia descrita por Gasic et al (2004). Na

metodologia original, há etapas, tais como: a utilização de um triturador para melhor ruptura do tecido e extração do RNA; a separação das amostras em diferentes tubos na etapa de precipitação com o cloreto de lítio; e o uso de substâncias inibidoras das enzimas degradadoras do RNA. Essas etapas, necessárias na extração de RNA de tecidos da macieira, aumentam o tempo da análise, bem como a manipulação da amostra, permitindo maior vulnerabilidade dessa amostra às enzimas degradadoras e, por isso, faz-se necessária a utilização de inibidores para essas enzimas. Esse último fato aumenta também o custo da análise. Nessa adaptação metodológica para as plantas nativas do Cerrado e da Amazônia, essas ações foram omitidas e, por isso, resultaram em um protocolo mais rápido, barato e com menor manipulação do material, evitando contaminações com enzimas degradadoras do RNA ou a necessidade da utilização de seus inibidores.

¹ Bióloga, D.Sc., pesquisadora da Embrapa Cerrados, crisrina@cpac.embrapa.br

² Biólogo, D.Sc., pesquisador da Embrapa Cerrados, rodrigo.fragoso@cpac.embrapa.br

³ Engenheira Agrônoma, Ph.D., pesquisadora da Embrapa Cerrados, marilia@cpac.embrapa.br

⁴ Bióloga, D.Sc., pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB - Av. W5 Norte (final), Caixa Postal 02372 - Brasília, DF - Brasil - 70770-917, leila@cenargen.embrapa.br

A metodologia adaptada, descrita neste documento, também baseia-se nos passos fundamentais, tais como: maceração do tecido em nitrogênio líquido (porém sem a etapa de trituração); lise da membrana plasmática, solubilização e adsorção de componentes fenólicos e (ou) oxidativos intracelulares em tampão que contém polivinilpirrolidona (PVP), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e 2 mercaptoetanol; precipitação diferencial do RNA com cloreto de lítio (no mesmo tubo) e purificação deste por precipitação com etanol (Tabela 1 e Figura 1).

Este protocolo tem as seguintes vantagens:

- Boa eficiência na extração do de plantas nativas do Cerrado e Amazônia para análises moleculares posteriores (Tabela 2).
- Extração de RNA com qualidade e quantidade necessárias para as análises moleculares (Figuras 1 e 2; Tabela 2).
- Menor custo, menor manipulação do RNA e menor tempo para obtenção.

Tabela 1. Procedimento padrão estabelecido para extração do RNA de plantas nativas.

Passo	Procedimento
1	Coletar aproximadamente 1,5 g de folhas da planta selecionada e imediatamente congelar em nitrogênio líquido
2	Pré-aquecer 10 mL do tampão de extração (TE) (2% CTAB; 2% PVP; 100mM Tris/HCl, pH 8; 25mM EDTA; 2 M NaCl; 2% 2-mercaptoetanol) a 60 °C; adicionar 2-mercaptoetanol imediatamente antes do uso
3	Macerar até formar um pó o tecido vegetal coletado em nitrogênio líquido e depois adicionar o tampão pré-aquecido; agitar
4	Incubar o tubo por 15 min a 60 °C; Agitar a amostra em intervalos de 5 minutos
5	Adicionar um volume igual de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e agitar por 10 minutos
6	Centrifugar a 7.649 Xg por 10 min (rotor Sorvall SS-34)
7	Coletar a fase aquosa para um tubo novo e repetir os passos 5, 6, 7
8	Adicionar à fase aquosa 1/3 do volume da solução de cloreto de lítio a 7,5 M
9	Precipitar a 4 °C no gelo pela noite
10	Centrifugar a amostra a 7.649 Xg por 30 min (rotor Sorvall SS-34)
11	Solubilizar o precipitado em 1.8 mL de água MilliQ estéril e previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), adicionar 0,2 volumes da solução de acetato de sódio 2M (pH 5,2) e 2 volumes de etanol 100%. Deixar precipitando por 2 horas a -20 °C
12	Centrifugar a 7.649 Xg por 30 min (rotor Sorvall SS-34)
13	Descartar o sobrenadante; lavar o precipitado com etanol 70%; centrifugar a 7.649 Xg por 10 minutos (rotor Sorvall SS-34)
14	Solubilizar o precipitado em 200 µL de água MilliQ estéril previamente tratado com DEPC; Quantificar em espectrofotômetro a OD260, OD280 e OD230 e visualizar em gel de formaldeído a 1,5%

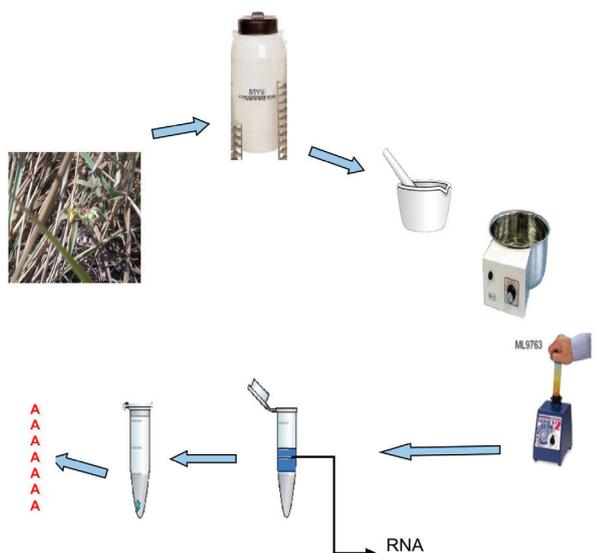


Figura 1. Esquema que demonstra os passos fundamentais para a obtenção de RNA a partir de plantas nativas do Bioma Cerrado e da Amazônia.

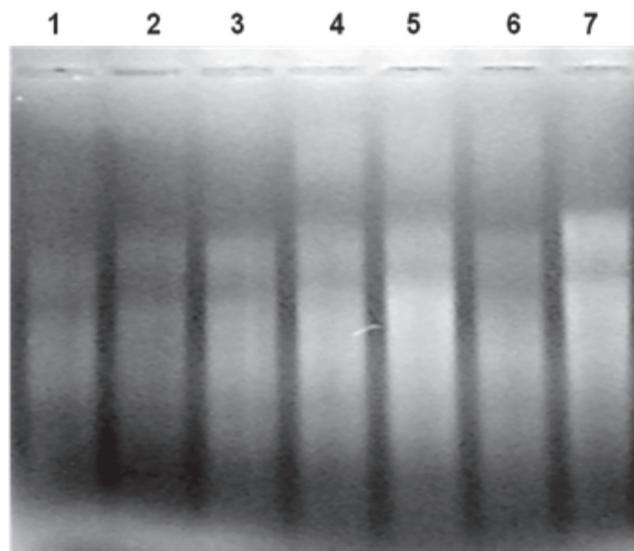


Figura 2. Amostras de RNA após extração com o Protocolo estabelecido, visualizado em gel desnatante de agarose 1,5%, formaldeído 2,2 M . 1 – *Justicia lansyaki*; 2 – *Porophyllum obscurum*; 3 – *Oxalis pyreneae*; 4 – *Lippia lupulina*; 5 – *Lippia alba*; 6 – *Hyptis spp.*; e 7 – *Heliotropium salicoides*. 5 µg de RNA total por amostra.

Tabela 2. Quantificação do RNA extraído das plantas hiperacumuladoras de níquel da região de Barro Alto, GO.

Plantas (espécies)	Quantidade de RNA total extraído (µg/ 1,5 g) (mín. 2µg / máx. 200µg)	Relação DO 260 / DO 280	Relação DO260 / DO230
<i>Justicia lansyaki</i>	64,3	2	1,94
<i>Porophyllum obscurum</i>	108,4	2,24	3,68
<i>Lippia lupulina</i>	126,1	2,22	2,86
<i>Lippia alba</i>	181,4	1,76	1,6
<i>Oxalis pyreneae</i>	161,4	1,72	0,76
<i>Hyptis spp.</i>	165,4	1,73	1,39
<i>Heliotropium salicoides</i>	214,2	1,81	1,55

Como pode ser observado na Tabela 2, essa adaptação metodológica é capaz de fornecer de 2 a 200 µg totais de RNA, com qualidade para análises moleculares, a partir de cerca de 1,5 g de folhas de plantas nativas coletadas a campo. A metodologia descrita por Gasic et al (2004) extrai de 25 a 900 µg de RNA total a partir de 1,0 g de diferentes tecidos da macieira (botão, flor, caule e fruto). Apesar de essa adaptação parecer pouco eficiente quando comparada à original, é conveniente salientar que a eficiência da extração do RNA total de plantas com

qualidade para análises moleculares varia de planta para planta e, por isso, a comparação da eficiência da extração nos tecidos da macieira não pode ser tomada como parâmetro fundamental para comparar com plantas nativas coletadas em campo aberto. Além disso, a quantidade obtida do material vegetal nativo é suficiente para as análises moleculares (mínimo 2 µg totais), e o mesmo pôde ser obtido íntegro como pode ser observado na análise em gel desnatante de agarose 1,5%; formaldeído 2,2 M (Figura 2).

Ainda com respeito à qualidade do RNA total obtido das plantas nativas, pode ser observado na Tabela 2 que a razão da densidade óptica (DO) obtida nos comprimentos de onda de 260 nm/280 nm e 260 nm/230 nm demonstra que são bem próximas da razão ótima de 1:8 ou 2 para os dois casos. A primeira relação demonstra o nível de purificação do RNA em relação às proteínas e, no segundo caso, o nível de purificação com relação à presença de compostos fenólicos na amostra. Em alguns casos, essa relação foi mais baixa ou mais alta, porém este resultado não afetou as análises em Reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), como pode ser observado na Figura 3, para as espécies *Justicia lanstyiaki* e *Porophyllum obscurum*. A primeira espécie foi uma das que apresentou um dos melhores resultados e a segunda, um dos piores. A amplificação de mais de um fragmento na amostra de *Porophyllum obscurum* sugere a possível amplificação de diferentes genes para a actina que estão expressos nessa planta.

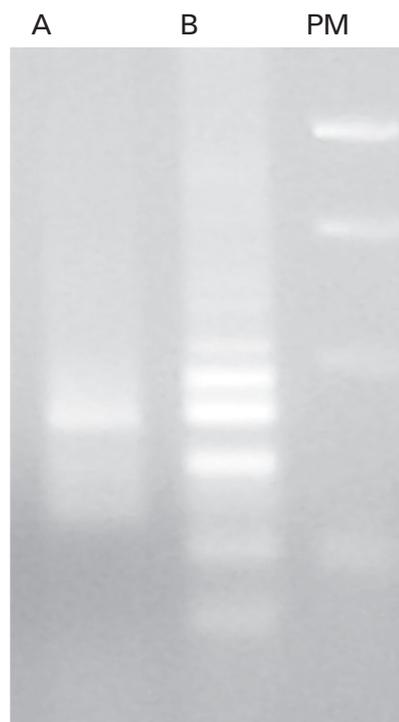


Figura 3. Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio da reação de RT-PCR com primers específicos para Actina. A – *Justicia lanstyiaki*; B – *Porophyllum obscurum*; PM – marcador de peso molecular (1KB). A seta indica o tamanho do principal fragmento amplificado para o gene da actina.

Referências

GASIC, K.; HERNANDEZ, A.; KORBAN, S. S. RNA extraction from different apple tissues rich in polyphenols and polysaccharides for cDNA library construction. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22, p. 437a-437g, 2004.

Procedure for RNA Extraction from Native Plants of Cerrado and Amazon Biomes

Abstract

The document presents an adapted procedure in order to obtain high quality RNA in good quantity and quality from Amazon and/or Cerrado native plants for molecular analysis such as Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Index terms: methodology, purification, ribonucleic acid.

Comunicado Técnico, 170

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Cerrados
Endereço: BR 020 Km 18 Rod. Brasília/Fortaleza
 Caixa postal: 08223 CEP 73310-970
Fone: (61) 3388-9898 **Fax:** (61) 3388-9879
 sac@cpac.embrapa.br

1ª edição
 1ª impressão (2010): 100 exemplares
 Edição online (2010)

Ministério da
 Agricultura, Pecuária
 e Abastecimento



Comitê de publicações

Presidente: Fernando Antônio Macena da Silva
Secretária Executiva: Marina de Fátima Vilela
Secretária: Maria Edilva Nogueira

Expediente

Supervisão editorial: Jussara Flores de Oliveira Arbués
Equipe de revisão: Francisca Elijani do Nascimento
 Jussara Flores de Oliveira Arbués
Assistente de revisão: Elizelva de Carvalho Menezes
Normalização bibliográfica: Paloma Guimarães C. Oliveira
Editoração eletrônica: Renato Berlim Fonseca
Impressão e acabamento: Divino Batista de Souza
 Alexandre Moreira Veloso