

CIRCULAR TÉCNICA

n. 231 - novembro - 2015

ISSN 0103-4413



Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
Departamento de Informação Tecnológica

Av. José Cândido da Silveira, 1.647 - União - 31170-495
Belo Horizonte - MG - site: www.epamig.br - Tel. (31) 3489-5000



Uso de diferentes protocolos para extração de DNA de pinhão-manso¹

*Luciana Nogueira Londe²
Anunciene Barbosa Duarte³
Silvia Nietzsche⁴
Pedro Thiago Medeiros Paixão⁵
Débora Francine Gomes Silva Pereira⁶
Selma Silva Rocha⁷
Lucas Borges Ferreira⁸*

INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta perene que possui ampla distribuição no mundo e cresce rapidamente, mesmo em solos pobres. É adaptável a uma ampla faixa climática, com precipitação média de 480 a 2.380 mm, e encontra-se em altitude de 0 a 1.000 m acima do nível do mar (ARRUDA et al., 2004).

Embora o pinhão-manso apresente inúmeras vantagens que possam ser exploradas no melhoramento, muito ainda precisa ser feito. Para a aplicação de tecnologias da engenharia genética, o DNA da espécie deve ser extraído e purificado. Pelo fato de suas folhas apresentarem grande quantidade de água e produção de látex, a obtenção de um DNA em quantidade e qualidade adequadas é considerada difícil, o que justifica a necessidade de otimizar protocolos para esta espécie.

A otimização de extração de DNA visando aos estudos moleculares depende diretamente de qualidade, pureza e quantidade adequada para a manipu-

lação do DNA extraído (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2001). A obtenção de DNA de boa qualidade, por sua vez, é um passo fundamental para o sucesso das análises moleculares.

Com isso, objetivou-se, neste trabalho, verificar a eficácia de diferentes protocolos para a extração de DNA de pinhão-manso.

COLETA DO MATERIAL

Amostras dos tecidos foliares de 18 acessos de pinhão-manso da coleção de germoplasma foram coletadas, dando-se preferência às folhas jovens, livres de doenças e sem qualquer dano físico aparente. O material foi devidamente identificado e encaminhado ao Laboratório de Biotecnologia da EPAMIG Norte, Nova Porteirinha, MG, onde foi armazenado em um ultrafreezer (-80°C). Para a extração de DNA, as amostras foram submetidas a dois protocolos distintos, com o objetivo de avaliar a eficiência dos métodos na qualidade do DNA.

¹Circular Técnica produzida pela EPAMIG Norte, (38) 3834-1760, epamignorte@epamig.br

²Bióloga, D. Sc., Pesq. EPAMIG Norte/Bolsista FAPEMIG, Nova Porteirinha, MG, luciana@epamig.br

³Graduanda Agronomia UNIMONTES, Janaúba, MG, cieneduarte@live.com

⁴Eng^a Agr^a, Pós-Doc, Prof^a UNIMONTES-Depto. Ciências Agrárias, Janaúba, MG, silvia.nietzsche@unimontes.br

⁵Graduando Agronomia UNIMONTES, Janaúba, MG, pedrothiago@hotmail.com

⁶Eng^a Agr^a, M.Sc., Prof^a UNIMONTES-Depto. Ciências Agrárias, Janaúba, MG, deborafrancinep@yahoo.com.br

⁷Graduanda Agronomia UNIMONTES, Bolsista FAPEMIG/EPAMIG Norte, Nova Porteirinha, MG, selmauniagro@gmail.com

⁸Graduando Agronomia UNIMONTES, Janaúba, MG, luckasborges2010@hotmail.com

Protocolo 1

No Protocolo 1, a extração de DNA foi realizada utilizando-se o protocolo proposto por Basha e Sujatha (2007).

O tecido congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi macerado com nitrogênio (N_2) líquido em um cadinho com o auxílio de um pistilo. Aproximadamente 0,250 g da amostra foi colocada em microtubos de 2 mL, adicionaram-se 800 μL de tampão de extração (2% CTAB; 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH8; 100 mM Tris-HCl pH 8,0; 3% PVP; 1% β -mercaptoetanol) e as amostras foram incubadas a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 1 hora em banho-maria. A cada 10 minutos as amostras eram agitadas com o uso do vórtex. O extrato foi submetido a duas extrações com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), centrifugados por 5 minutos a 14.000 rpm em temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, com posterior transferência dos sobrenadantes para novos microtubos de 1,5 mL. Os ácidos nucleicos na fase aquosa foram precipitados com isopropanol na proporção de 1:1 do volume recuperado e incubados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Em seguida foram centrifugados por 15 minutos a 14.000 rpm em temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após esta etapa o sobrenadante foi removido e o precipitado mantido à temperatura ambiente por 15 a 20 minutos para secar. Após a secagem, o precipitado foi lavado uma vez com etanol 70% e outra vez com etanol 95%.

A partir desta etapa foi feita uma modificação para a purificação do DNA (MICHAELS; JOHN; AMASINO, 1994). Foi adicionada ao precipitado uma solução de 500 μL (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,25 M NaCl) e com auxílio do vórtex procedeu-se à dissolução. Em seguida foram adicionados 180 μL de etanol absoluto gelado e as amostras permaneceram no congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante a noite.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 14.000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo sendo adicionado 700 μL de isopropanol. Essa mistura foi mantida por 15 minutos à temperatura ambiente e em seguida centrifugada por 20 minutos a 14.000 rpm, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Realizaram-se a remoção do sobrenadante e a lavagem do precipitado com etanol 70% e etanol 95%. O precipitado foi novamente dissolvido com 200 μL de Tris-EDTA (TE) pH 8,0 (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA), contendo RNase na concentração final de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A solução foi incubada em banho-maria a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Após a incubação adicionaram-se NaCl 5M na proporção de 1:10 e 2/3 do volume de isopropanol gelado para a precipitação do DNA,

sendo incubado novamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 2 a 3 horas. Posteriormente foi realizada a centrifugação e a lavagem do precipitado com etanol 70% e 95 % e, finalmente, ressuspenso em 200 μL de TE.

Protocolo 2

No Protocolo 2, a extração de DNA foi realizada de acordo com o método CTAB proposto por Doyle e Doyle (1990) com modificações.

Aproximadamente 300 mg de folhas jovens foram maceradas em N_2 líquido com auxílio de almofariz e pistilo e transferidas para microtubos de 2 mL. Em seguida, 800 μL de tampão de extração, de acordo com método CTAB (2% de CTAB, EDTA – 0.5 M pH 8,0, Tris-Cl – 1 M pH 8,0, NaCl 5M, 2% de PVP-40) foram adicionados.

As amostras foram incubadas em banho-maria a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cerca 30 minutos, invertendo-se os microtubos a cada 10 minutos. Após esta fase, as amostras receberam 800 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), procedendo-se à homogeneização por 2 minutos. Em seguida foram centrifugadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos a 13.500 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo (1,5 mL). Para a precipitação do DNA, adicionaram-se 500 μL de isopropanol gelado ao sobrenadante, incubando-se as amostras por 1 hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para a lavagem do precipitado, os tubos foram submetidos a uma nova centrifugação a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 5 minutos a 13.000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se ao precipitado o volume de 450 μL de etanol 70%, e logo em seguida, procedeu-se à centrifugação por 5 minutos a 13.000 rpm, descartando novamente o sobrenadante (etanol), seguida de nova purificação com etanol 70%. O precipitado foi seco em temperatura ambiente e ressuspendido com 60 μL de TE (100 mM Tris / 10 mM EDTA). Foi realizada uma nova purificação, adicionando-se às amostras 140 μL de TE e 300 μL de etanol absoluto, homogeneizando-as e incubando-as a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora. Procedeu-se a uma nova centrifugação a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 13.000 rpm, por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante. O precipitado foi lavado novamente por duas vezes com etanol 70% (300 μL) centrifugação a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 13.000 rpm, por 5 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi descartado, o precipitado seco em temperatura ambiente e ressuspendido com 60 μL de TE.

Para a verificação da qualidade do DNA de ambos os protocolos foi utilizado um mini gel de agarose 0,8%, corado em solução de brometo de etídeo (0,2 mg/L) para visualização das bandas.

ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS GÉIS

Com base na visualização das bandas nos géis de agarose, observaram-se diferenças entre os dois protocolos avaliados (Fig. 1 e 2). O Protocolo 1 (Fig. 1), proposto por Basha e Sujatha (2007), apresentou resultados que indicam superioridade deste método quando comparado ao Protocolo 2 (Fig. 2), CTAB proposto por Doyle e Doyle (1990). A avaliação visual, no gel de agarose, indicou que o Protocolo 1 permitiu extrair o DNA de quase todas as amostras. No entanto, para algumas amostras observaram-se sinais de degradação, com leves contaminações por proteínas. Modificações ainda podem ser feitas para melhorar a qualidade do DNA de pinhão-mansô.

Neste estudo, o Protocolo 2 manteve DNA de qualidade inferior, quando comparado ao Protocolo 1. Grande parte das amostras extraídas apresentou sinais fortes de degradação e contaminação com proteínas. Segundo Machado (1990), o método CTAB tem sido muito utilizado para extração de tecidos frescos. Entretanto, ajustes expressivos deverão ser adicionados, visando à melhoria deste procedimento para a extrair o DNA de pinhão-mansô.

O objetivo de qualquer protocolo de extração é a obtenção de DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente. Os protocolos de extração devem evitar a degradação do DNA pelas DNases, eliminar tanto os polissacarídeos que ini-

bem a ação de enzimas quanto as substâncias fenólicas ou outros compostos secundários que podem danificar o DNA.

Verificou-se, também, que o Protocolo 1, proposto por Basha e Sujatha (2007), mostrou-se mais eficiente para a extração do DNA genômico de pinhão-mansô, apresentando um padrão de bandas mais homogêneo, com bom índice de pureza. O DNA apresentou melhor qualidade e poucas amostras encontraram-se contaminadas por proteínas. O sucesso deste Protocolo, provavelmente, está relacionado com o fato de o processo de extração ser mais demorado, possibilitando maior contato entre as amostras e os reagentes. Assim, o DNA obtido pelo Protocolo 1 encontra-se em boas condições, podendo ser utilizado em quaisquer uma das técnicas de biologia molecular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Protocolo 1, proposto por Basha e Sujatha (2007), foi o que obteve maior êxito para extração do DNA genômico de pinhão-mansô.

REFERÊNCIAS

ADEBOWALE, K.O.; ADEDIRE, C.O. Chemical composition and insecticidal properties of the under utilized *Jatropha curcas* seed oil. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.10, p.901-906, May 2006.

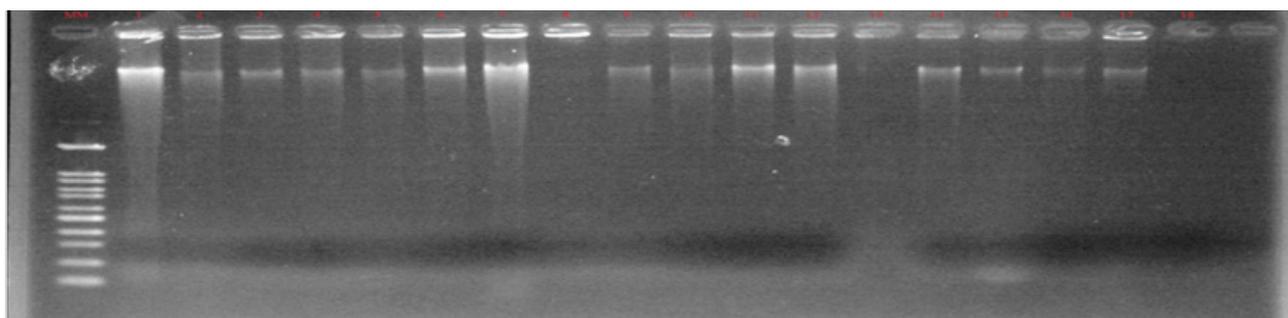


Figura 1 - Análise eletroforética do DNA genômico de pinhão-mansô utilizando-se o Protocolo 1

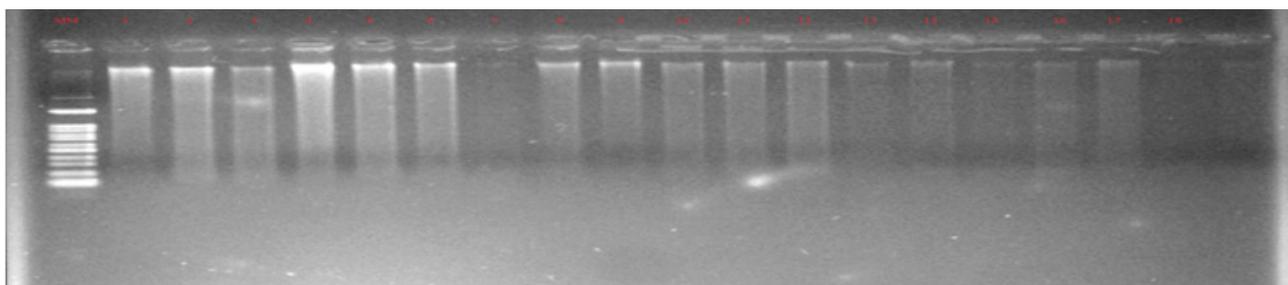


Figura 2 - Análise eletroforética do DNA genômico de pinhão-mansô utilizando-se o Protocolo 2

Anunciene Barbosa Duarte

Anunciene Barbosa Duarte

- ARRUDA, F.P. et al. Cultivo de pinhão mansô (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.8, n.1, p.789-799, jan./abr. 2004.
- BASHA, S.D.; SUJATHA, M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L). characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers. **Euphytica**, v.156, n.3, p.375-386, Aug. 2007.
- BUENO, L.C. de S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. **Melhoramento genético de plantas**. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.
- DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13-15, 1990.
- MACHADO, M.A. Isolation of DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, n.1, p.13, 1990.
- MICHAELS, S.D.; JOHN, M.C.; AMASINO, R.M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation. **Biotechniques**, v.17, n.2, p.274-276, Aug. 1994.