

ESTUDO COMPARATIVO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO EM AVES, BOVINOS E BÚFALOS

DA PONTE, Letiane Nascimento¹; CERQUEIRA, Natália Menezes¹; TRESBACH, Rafael Henke², DUARTE, Rodrigo Teixeira³; DEGRANDI, Tiago Marafiga⁴; RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes^{5,6}

¹Graduação em Ciências Biológicas - Bacharelado, UNIPAMPA; ²Graduação em Biotecnologia, UNIPAMPA; ³Graduação em Medicina Veterinária, UFPEL; ⁴Mestrado em Ciências Biológicas, UNIPAMPA; ⁵Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPEL; ⁶Genética Animal, UNIPAMPA
letitdp@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

Obter DNA genômico com qualidade e em quantidade apropriada, para amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), é um dos mais importantes fatores em pesquisas e diagnósticos laboratoriais (BASSINI, et al., 2009). Vários procedimentos de extração de DNA são citados na literatura, sendo que em muitos casos os protocolos disponíveis são utilizados com algumas adaptações, buscando-se solucionar problemas específicos de uma determinada espécie.

Estudos básicos sobre técnicas específicas de extração de DNA são de extrema importância para obter sucesso na localização em amplificação das regiões desejadas, garantindo sucesso de trabalhos científicos no campo da biologia molecular (SOLLERO et al., 2004).

Independente do tipo de estudo molecular, as amostras produzidas nas preparações de DNA, devem ser suficientemente puras, para que não haja interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (Romano & Miranda, 1999). Portanto, isso indica que testes devem ser aplicados a novos protocolos para diferentes espécies, visando à criação de novas metodologias, bem como o aprimoramento das já existentes (ALMEIDA, et al., 2009).

Muitos protocolos de extração de DNA são baseados em kits comerciais com altos custos. Extração de DNA obtida a partir de pena, pelos, sêmen congelado, entre outros, têm sido bastante usada em bovinos e búfalos com resultados satisfatórios. Segundo Coelho et al. (2004), em bovinos de raças zebuínas, foi verificado que a concentração de DNA de pelos são compatíveis na questão qualidade, com os DNAs obtidos através de métodos de coletas invasivas (DNA extraído a partir de sangue). Já para aves não existe um protocolo de extração de DNA padrão.

Diante desta constatação, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a eficiência da extração de DNA de sangue de aves, bovinos e búfalos a partir de um protocolo comumente utilizado para a extração de DNA de sangue de peixes, visando a diminuição de custos bem como a busca de uma melhor qualidade na extração.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para realização deste trabalho, foram utilizadas um total de 20 amostras de sangue total, destas 16 amostras pertenciam a búfalos (*Bubalus bubalis*) coletadas em tubos vacum com heparina e armazenadas por 2 anos, 1 amostra de ave (*Galus domesticus*) armazenada por 4 meses e duas amostras de sangue bovino (*Bos taurus*) coletadas em tubo vacum com EDTA e armazenadas por 1 ano.

De cada amostra foi utilizada 250µl de sangue em um microtubo de 1,5 ml e resuspendida em 600µl de tampão TNE1 homogeneizado fortemente com a amostra por agitação mecânica, posteriormente a amostra foi centrifugada por 10 minutos à 3000g, desprezou-se o sobrenadante tomando-se o cuidado de não perder os sólidos depositados ao fundo do tubo. Esse procedimento foi repetido três vezes, potencializando a ruptura dos tecidos e a desnaturação das membranas celulares e também eliminando resíduos que pudessem interferir na qualidade da extração.

Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em tampão com 330µl de TNE e tratadas com 4µl de proteinase K (5µg/µl) juntamente com 5µl de RNase (1,2µg/µl) e incubadas por 12 horas em banho-maria à 50°C.

Para precipitação de proteínas e restos celulares, as amostras foram homogeneizadas em 340µl de NaCl 5M por inversão e centrifugadas por 10 minutos à 12000g. Posteriormente foram transferidos 500µl do sobrenadante para um novo microtubo.

Para precipitação do DNA, foi utilizado 900µl de etanol absoluto gelado (-4°C), após várias inversões a solução foi acondicionada por uma hora a -20°C.

Após decorrido o tempo, a mostra foi centrifugada por 10 minutos à 12000g. A fase líquida foi então desprezada e foram feitas três lavagens com etanol 70% gelado (-4°C), ao final as amostras foram incubadas em estufa a 40°C para secar e finalmente resuspendidas em 100µl de água estéril ou TE.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi testado um protocolo de extração de DNA de peixes em búfalos, aves e bovinos, como está sendo mostrado na figura 1. Este protocolo foi satisfatório para aves e em algumas amostras de búfalos e bovinos. As extrações foram obtidas livre de impurezas, porém com qualidade não tão boa.

Segundo Bassini, et al. (2009), a extração de DNA para bovinos através do Kit NucleoSpin® Blood QuickPure, foi de excelente qualidade e livre de impurezas, mas para peixes os resultados não foram positivos, provavelmente em função de características das células sanguíneas, sabendo que peixes possuem hemácias nucleadas, enquanto em bovinos são anucleadas.

Observou-se durante o processo de extração que algumas amostras se apresentaram um pouco gelatinosas, o que pode ter interferido na qualidade da extração. O tempo de armazenagem prolongado das amostras também pode ter sido outro fator que interferiu.

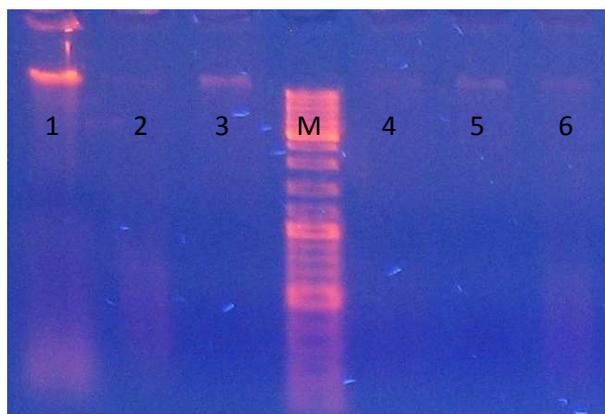


Figura 2 - Padrão de extração de DNA testado com uma amostra de sangue de ave (1), duas amostras de sangue bovino (3 e 5), e quatro diferentes amostras de sangue de Búfalo (2, 4 e 6).

4 CONCLUSÃO

Através de testes como este, protocolos utilizados para uma determinada espécie, poderão ser adaptados e utilizados em outras, solucionando dificuldades em extrações com protocolos de valor agregado e ampliando as possibilidades de se realizar uma obtenção de DNA com qualidade e baixo custo.

5 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Diones Bender; SANTOS, Alceu Gonçalves dos; COSTA, Marco André Paldês da; OLIVEIRA, Plínio Aguiar de; BASSINI, Liane Ney; MOREIRA, Carla Giovani Ávila; TAVARES, Rafael Aldrighi; MOREIRA, Heden Luiz Marques. In: **XVIII CIC XI ENPOS I MOSTRA CIENTÍFICA**, Pelotas, 20 a 23 de outubro de 2009.
- BASSINI, Liane Ney; ALMEIDA, Diones Bender; COSTA, Marco André Paldês da; OLIVEIRA, Plínio Aguiar de; MOREIRA, Carla Giovani Ávila; MOREIRA, Heden Luiz Marques. In: **XVIII CIC XI ENPOS I MOSTRA CIENTÍFICA**, Pelotas, 20 a 23 de outubro de 2009.
- COELHO, E.G.A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 56, n. 1, p. 111-115, 2004.
- ROMANO, E.; MIRANDA, A. C. B. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, 1999, v.2, n.9, p.40-43.
- SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 13.**, 2004. Brasília. *Anais...* Brasília: SBZ, 2004. CD-ROM.