

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



UTILIZAÇÃO DE UM NOVO PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA EM TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)

ALMEIDA, Diones Bender¹; SANTOS, Alceu Gonçalves dos²; COSTA, Marco André Paldês da¹; OLIVEIRA, Plínio Aguiar de²; BASSINI, Liane Ney²; MOREIRA, Carla Giovani Ávila²; TAVARES, Rafael Aldrighi¹; MOREIRA, Heden Luiz Marques³

¹ Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e Laboratório de Engenharia Genética Animal, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, s/nº.; 96010-900 - Pelotas, RS. diones_almeida@yahoo.com.br

² Laboratório de Engenharia Genética Animal, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário, Capão do Leão, S/Nº.; 96010-900 - Pelotas, RS.

³ Professor adjunto do Departamento de Zoologia e Genética/ UFPel, Chefe do Laboratório de Engenharia Genética Animal, Orientador.

1. INTRODUÇÃO

No ramo da tilapicultura, estudos genéticos, através da extração do DNA e utilização de marcadores moleculares, estão se tornando muito comuns. Por se tratar de uma poderosa ferramenta, oferece informações úteis para o direcionamento de programas de melhoramento e manejo de bancos genéticos (Moreira, 2001; Melamed et al., 2002; Povh et al., 2003). Um dos peixes que vem apresentando grande potencial em termos de engenharia genética voltada ao melhoramento dos estoques é a tilápia do Nilo (Suganuma, 2004).

Estudos básicos sobre metodologias específicas que possam otimizar extrações de DNA de boa qualidade, são de grande importância para que regiões desejadas sejam localizadas e amplificadas, e garantir sucesso em trabalhos científicos no campo da biologia molecular (Solléro et al., 2004).

Existem na literatura vários protocolos para extração de DNA genômico a partir de material armazenado em EDTA ou álcool, no entanto alguns são mais laboriosos enquanto outros mais simplificados (Fungaro & Vieira, 2001). A obtenção de DNA genômico de boa qualidade é essencial para se obter bons resultados em experimentos, especialmente no uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), nas quais os excessos de estruturas celulares e proteínas podem inibir o processo de amplificação (Saiki, 1990; Hoy, 1994). Independente do tipo de estudo molecular, as extrações de DNA devem apresentar um bom padrão de bandeamento, com quantidade e qualidade suficientes para não causar interferências nos padrões de migração em géis de eletroforese (Romano & Miranda, 1999). Isso indica que novos protocolos ainda necessitam ser testados para diferentes espécies, com objetivo de desenvolver novas metodologias ou até mesmo aprimorar as já existentes.

Diante desta constatação, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da extração de DNA de sangue de tilápias, a partir de um protocolo comumente utilizado para detecção de DNA de patógenos em eqüinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A partir do Kit “NewGene Preamp”, desenvolvido para purificação de DNA de patógenos em eqüinos, buscou-se testar sua aplicabilidade na extração de DNA em tilápias (*Oreochromis niloticus*). É comum que um protocolo desenvolvido para uma espécie nem sempre funcione para outras, mas muitas vezes alguns ajustes podem levar ao êxito da extração.

Foram utilizadas seis amostras de sangue de tilápias armazenadas em EDTA, todas coletadas no Laboratório Experimental de Peixes, localizado no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Em um tubo de eppendorf (1,5mL) foram somados 100µL de sangue e 900µL de Mix de Lise (Kit Simbios). A solução foi então homogeneizada em vórtex por 3 min.. Em seguida, o conjunto foi incubado por 10 min. em banho-maria (60°C). Adicionou-se 20µL de suspensão de sílica (Kit Simbios), agitando vigorosamente as amostras antes de pipetar a sílica e incubá-las novamente por 10 min.. A cada 2 min. inversões dos tubos foram feitas. 150µL de solução de lavagem (Kit Simbios) foi acrescentada, homogeneizando fortemente as amostras até desfazer o *pellet*. Por 1 min. a 10.000rpm a suspensão foi centrifugada e desprezou-se o sobrenadante. Essa limpeza foi repetida duas vezes. Etanol 75% (150µL) foi misturado as amostras revolvendo-as até dissolver o pellet. O sobrenadante foi então desprezado após centrifugação por 1 min. a 10.000rpm. O procedimento de limpeza com etanol também foi repetido duas vezes. 150µL de acetona foram acrescentados, agitando em vórtex para solubilizar o *pellet*. O sobrenadante foi novamente desprezado após centrifugação por 1 min. a 10.000rpm, retirando o máximo de acetona possível com auxílio de uma micropipeta. Desse modo os tubos foram secos em estufa a 60°C por 10 min.. Para efetuar a eluição das amostras, adicionou-se 50µL de água Milli-Q levando ao banho-maria (37°C) por 15 a 20 min., para a remoção da sílica. Por fim, centrifugou-se o material por 3 min. a 10.000rpm transferindo a solução para outro microtubo (aproximadamente 40µL da solução contendo o DNA extraído).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo foi testado um protocolo de extração de DNA de patógenos em eqüinos para tilápias, o qual pode ser observado através da figura 1, mostrando que o procedimento é perfeitamente aplicável.

É importante destacar que esse método mostrou-se satisfatório quanto à facilidade de uso, rapidez na extração e qualidade da amplificação do DNA. Esses resultados são relevantes quando comparado a outros métodos que muitas vezes utilizam compostos prejudiciais a saúde, como é o caso do fenol, utilizado em outros kits.

Muitos protocolos hoje disponíveis são utilizados pela sua rapidez ou até mesmo pelo seu custo, porém em alguns o padrão de bandas não é nítido, apresentando impurezas que prejudicam o seu deslocamento dentro do gel. Esse requisito é importante, pois obter qualidade na extração de DNA facilita a análise em géis de maior resolução. Cabe salientar ainda que o não funcionamento de muitas amplificações de PCR ocorre devido a uma escolha mal feita de protocolos de extração de DNA, o que pode inviabilizar sua utilização em trabalhos posteriores.

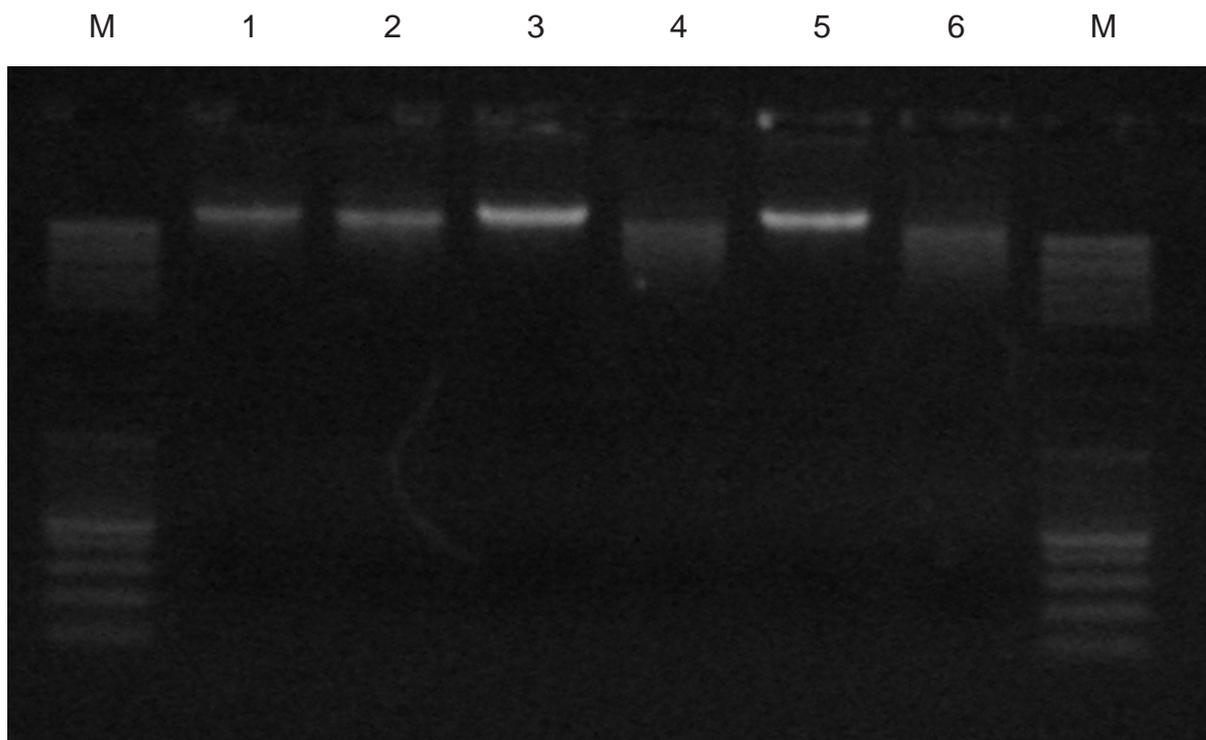


Figura 1 - Padrão de extração de DNA testado com seis (1-6) diferentes amostras de sangue de tilápias. M=Marcador de peso molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix – Fermentas, USA.

Vários procedimentos de extração de DNA têm sido descritos na literatura, considerando que métodos padrões são utilizados com algumas modificações, visando solucionar os problemas específicos da espécie em estudo. Deve-se lembrar ainda que a forma de coleta e a conservação do material são de grande importância para a obtenção do DNA em concentrações e qualidades adequadas (Solléro et al., 2004). A pureza do DNA é afetada significativamente pela condição na qual o sangue ou outro material é armazenado anteriormente a sua extração, sendo recomendada a utilização de material o mais fresco possível (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Com os resultados obtidos, acredita-se que muitos outros protocolos ainda deveriam ser testados, para que novos estudos com outras espécies possam desfrutar de seus benefícios. Somente através desses testes é que novos protocolos poderão ser utilizados a fim de solucionar dificuldades, não somente na tilapicultura, mas também em outros sistemas de produção.

4. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o protocolo utilizado para detecção de patógenos em eqüinos pode ser usado para extração de DNA genômico em tilápias.

5. AGRADECIMENTOS

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 1998. 220p.
- FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Marcadores moleculares. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; DE AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia na agricultura e na agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 2001, p.153-199.
- HOY, M. A. DNA amplification by the Polymerase Chain Reaction: molecular biology made accessible. In:_____. *Insect molecular genetics: an introduction principles and applications*. San Diego: Academic Press, 1994. p.203-244.
- MELAMED, P.; GONG, Z.; FLETCHER, G. et al. The potential impact of modern biotechnology on fish aquaculture. **Aquaculture**, 2002, v.204, p. 255-269.
- MOREIRA, H. L. M. Genética e melhoramento de peixes. In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO R.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna aqüicultura**. Canoas: ULBRA, 2001. p.135-147.
- POVH, J. A.; BLANCK, D. V.; PETRONILO, V.; MOREIRA, H. L. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L., CAVALLIERI, R. F. D.; BENITES, C. Comparação de duas linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 5., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 12., 2003, Uberaba. *Anais...* Uberaba: ABCZ – ABZ, 2003. p.417-421.
- 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.
- SAIKI, R. K. Amplification of genomic DNA. In: IINNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKI, J. J.; WHITE, T. J (Ed.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. p.13-20.
- 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.

SUGANUMA, C.H. **Caracterização de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de microssatélites**. Jaboticabal, 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.