

IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

João Pessoa, PB – 20 a 22 de junho de 2012

Avaliação quantitativa e qualitativa de métodos de extração alcalina do DNA a partir de amostras de sêmen, sangue e pêlos de ovinos (*Ovis aries*)¹

Aylton Bartholazzi Junior², Aline Pacheco³, Celia Raquel Quirino⁴, Eduardo Geraldo Alves Coelho⁵, Thiago da Silva Corrêa⁶, Aline Matos Arrais²

¹Parte da monografia do primeiro autor.

²Graduando Medicina veterinária - Universidade Estadual do Norte Fluminense – junior_barth@hotmail.com

³Pós Doutoranda – Universidade Estadual do Norte Fluminense/CCTA/LRMGA, Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - CEP: 28013-602

⁴Professora - Universidade Estadual do Norte Fluminense/CCTA/LRMGA

⁵Pesquisador UFMG

⁶Mestrando em Ciência Animal - Universidade Estadual do Norte Fluminense/CCTA/LRMGA

Resumo: O presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise comparativa da extração do DNA dos tecidos, para avaliar o emprego destas amostras nos estudos moleculares. Foi extraído DNA de três tecidos diferentes (sêmen, pêlo e sangue), de quatro reprodutores ovinos da raça Santa Inês. Após a extração todas as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c), para determinar a concentração do DNA, a pureza protéica e a pureza dos componentes químicos nas soluções utilizadas para extração. Para comprovar a eficiência da extração, as amostras foram submetidas à amplificação do DNA pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), através da amplificação do loco OarFCB 020. As amostras de sêmen apresentaram a maior concentração de DNA extraído e houve diferença significativa em relação às amostras de pêlo e sangue, que apresentaram médias semelhantes. Na pureza protéica as extrações do DNA de sêmen e pêlo apresentaram médias semelhantes e houve diferença significativa quando comparadas com a extração das amostras de sangue. Na pureza relacionada aos reagentes presentes, todas as amostras apresentaram resultados muito inferiores ao de referência, onde, as amostras de sêmen e sangue apresentaram médias semelhantes e significativamente superiores às amostras de pêlo. Todas as amostras das extrações mostraram-se eficientes para aplicação da técnica de PCR.

Palavras-chave: DNA, espectrofotômetro, extração, PCR, Santa Inês.

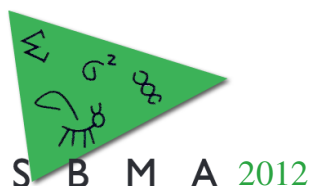
Quantitative and qualitative evaluation methods for alkaline extraction of DNA from semen samples, blood and hair sheep (*Ovis aries*)

Abstract: The present study aimed at comparing the extraction of DNA from tissues, to evaluate the use of these samples in the molecular studies. DNA was extracted from three different tissues (semen, hair and blood), four breeding sheep of Santa Inês. After extraction of all specimens were evaluated by spectrophotometer (NanoDrop 2000c) for determining the concentration of sample DNA, protein purity and the purity of chemical components in the solutions used for extraction. To prove the efficiency of extraction, the samples were subjected to DNA amplification by technique of polymerase chain reaction (PCR), the amplification of the loci OarFCB020. Semen samples showed the highest concentration of DNA extracted and significant differences for samples of hair and blood (which showed similar means). In pure protein extractions of DNA from semen and hair showed similar means and differences when compared with the extraction of blood samples. Related to the purity reagents in all samples tested well below the reference, where the semen and blood samples showed similar means and significantly higher than those of hair samples. All samples of the extractions were efficient for the application of PCR.

Keywords: DNA, spectrophotometer, extraction, PCR, Santa Inês.

Introdução

Atualmente, devido ao acelerado desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em nova fase, na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso de ferramentas da genética molecular. A seleção de reprodutores através do uso de marcadores genéticos permite a escolha do animal com base no seu genótipo, antes mesmo da expressão do fenótipo, acelerando o processo de seleção (GARCIA e PORTO NETO, 2006).



A extração do DNA é a primeira etapa necessária para iniciar os estudos genéticos. As pesquisas e desenvolvimento de novos protocolos para extração têm sido negligenciados, apesar do grande desenvolvimento da técnica da PCR e de suas diversas aplicações. Esse fato se deve a ampla utilização de kits comerciais para a etapa de extração.

A utilização de protocolos de extração do DNA, simples e com baixo custo, permite o emprego nas pesquisas e na rotina laboratorial, como uma alternativa ao uso dos kits de extração comerciais. Entretanto, estes procedimentos dependem principalmente da habilidade de se extrair DNA em quantidade suficiente e de uma amostra de boa qualidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do método de extração alcalina rápida e uma análise comparativa da extração do DNA, obtidos a partir da coleta de amostras de sangue, sêmen e pêlo de ovinos da raça Santa Inês; levando em consideração a eficiência de extração, a qualidade e a quantidade do DNA extraído de diferentes amostras para utilização na PCR.

Material e Métodos

Foram utilizados quatro machos ovinos da raça Santa Inês, pertencentes a fazendas da região Norte do estado do Rio de Janeiro/Brasil. Foi utilizada a técnica de extração alcalina simples do DNA pela técnica rápida de todas as amostras de sêmen, pêlo e sangue.

Em cada macho, foi realizada a coleta de sêmen com a utilização de eletroejaculador, avaliada a concentração espermática do ejaculado e armazenados a 4°C até o momento da extração. Foram coletados amostras de sangue, armazenadas em tubos com EDTA e resfriadas a 4°C e coletadas também pêlos da porção final da cauda dos animais e armazenadas em sacos de papel pardo.

Para a extração do DNA de sêmen foram utilizados 25 µL de sêmen, centrifugou a 13000 rpm por 5 minutos e descartou o sobrenadante. Acrescentou 50 µL de solução de lise (192,5 mM de NaOH), homogeneizou e levou ao termociclador por 15 minutos a 96°C. Centrifugou a 13000 rpm/1minuto e acrescentou 50 µL de solução B (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL).

Para cada extração do DNA de pêlo foram utilizados 10 bulbos cortados após visualização dos pêlos ao microscópio óptico com aumento de objetiva de 40X para a verificação da integridade e presença do bulbo. Para a extração de DNA foram adicionados 50 µL da solução de lise (200 mM de NaOH) aos 10 bulbos, homogeneizou e levou ao termociclador por 15 minutos a 96°C. Centrifugou a 13000 rpm/1minuto e acrescentou 50 µL de solução B (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL).

Na extração do DNA de sangue foram utilizados 100 µL de sangue total, centrifugou a 13000 rpm por 6 minutos e descartou-se o sobrenadante. Para lavagem, adicionou 400 µL de tampão NE (0,58 g NaCl, 3,72 g EDTA, 1 L H₂O ultra pura), centrifugou por 5 minutos a 13.000 rpm, retirou o sobrenadante e deixou aproximadamente 100 µL. Esta lavagem foi repetida por mais duas vezes. Descartou o sobrenadante, acrescentou 20 µL de solução de lise (200 mM de NaOH), levou ao termociclador por 15 minutos a 96 °C e centrifugou a 13.000 rpm por 5 minutos. Acrescentou 20 µL de solução B (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL) (adaptado da metodologia empregada pelo Stormont Laboratories Inc. Woodland CA-EUA).

A quantidade e a qualidade (pureza) do DNA extraído em todos os métodos realizados foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c). Foram utilizados o loco OarFCB020, utilizado para teste de diversidade genética em ovinos. Com o objetivo de validar os resultados obtidos, o loco escolhido foi testado pela técnica de PCR. Os resultados foram submetidos à análise de variância utilizando o programa estatístico SAS (2002).

Resultados e Discussão

A concentração do DNA extraído das amostras de sêmen apresentou a maior média, enquanto a extração do DNA das amostras de pêlo a menor média e ligeiramente inferior à média da extração das amostras de sangue, como destacado na Tabela 1. A diferença na média para a concentração do DNA extraído de sêmen é possivelmente explicada pela alta concentração espermática de 1900×10^6 espermatozoides/mL (50×10^6 espermatozoides/25µL), enquanto a concentração média de leucócitos (células nucleadas) é de $0,7 \times 10^6$ leucócitos/100µL (SANTANA et al., 2009), e um valor ainda não estimado de células nucleadas nos bulbos capilares, mas que possivelmente teria uma concentração inferior de células comparado com o sangue e com o sêmen.

Tabela 1 Médias de concentração e pureza do DNA extraído do sêmen, pêlo e sangue.

Tecido	Conc. (ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
Sêmen	1335,93 ^a \pm 228,05	1,54 ^a \pm 0,09	0,56 ^a \pm 0,06
Pêlo	197,40 ^b \pm 36,16	1,36 ^b \pm 0,13	0,27 ^c \pm 0,02
Sangue	219,98 ^b \pm 22,62	1,23 ^b \pm 0,03	0,45 ^b \pm 0,05

Médias na mesma coluna seguidas de letras diferentes diferem ($P < 0,05$) no teste SNK a 5% de probabilidade.

Na pureza proteica (A260/A280) as extrações do DNA das amostras de sêmen e pêlo apresentaram médias semelhantes, se destacando como as mais puras, chegando mais perto do valor de referência (1,8) (Manual NanoDrop, 2010). As amostras de sangue apresentaram a menor pureza, com valores bem abaixo das outras amostras, supostamente, pela presença de células anucleadas (eritrócitos), que não fornecem DNA e aumenta a concentração de proteínas. Na razão A260/A230 (relacionado a reagentes inibitórios da PCR) a extração do DNA das amostras de sêmen apresentou-se como a mais pura, as do DNA das amostras de sangue com uma média intermediária e na extração do DNA das amostras de pêlos como menos pura. Todas as amostras apresentaram médias bem abaixo do valor de referência para amostras puras (1,8 – 2,2) (Manual NanoDrop, 2010), possivelmente por não utilizar etapas de purificação nos protocolos.

Todas as amostras do DNA extraídas a partir das amostras de sêmen, pêlo e sangue, mostraram ampliações consistentes para o loco OarFCB020, mostrando que as contaminações encontradas na avaliação qualitativa (A260/A280 e A260/A230), não foram suficientes para inibir a PCR. A concentração do DNA mesmo após a diluição em 1:50, se mostrou suficiente para a amplificação dos fragmentos. As amostras na eletroforese em gel de poliacrilamida apresentaram perfil similar entre todas às amostras extraídas, como mostrado na Figura 1. As bandas apresentaram-se dentro da expectativa para o loco OarFCB020 com tamanhos entre 92 a 118 pb.

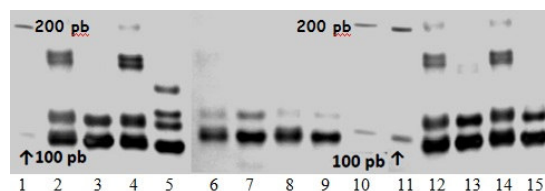


Figura 1 Eletroforese em gel de poliacrilamida da amplificação do loco OarFCB020 (92-118 pb). Poço 1, 10 e 11= lader, poço 2 – 5= sêmen, poço 6 – 9= pêlo e poço 12 – 15= sangue.

Conclusões

Pode-se concluir que os protocolos alcalinos rápidos se mostraram eficientes para a obtenção do DNA em quantidade e qualidade satisfatória para a utilização na PCR. A técnica mostrou-se rápida, prática, de baixo custo, sendo ideal para uso na rotina laboratorial.

As amostras de pêlo se destacaram por permitir uma coleta rápida, não invasiva e pode ser armazenada em temperatura ambiente. Entretanto não foi observado diferença na amplificação do DNA, sendo todas as amostras testadas eficientes para serem empregadas na técnica PCR.

Literatura citada

- GARCIA, J. F.; PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 197-203, 2006. Supl1.
- MANUAL NANODROP. Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers Nucleic Acid. 30 p., 2010.
- SANTANA, A.M.; SILVA, D.G.; BERNARDES, P.A.; PIZAURO, L.J.L.; MALUTA, R.P.; AQUINO, G.V.; GARCIA, K.O.; ÁVILA, F.A.; FAGLIARI, J.J. Hemograma e perfil bioquímico sérico de ovinos em idade de abate. *Ciência Animal Brasileira – Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria*, suplemento 1, 2009.