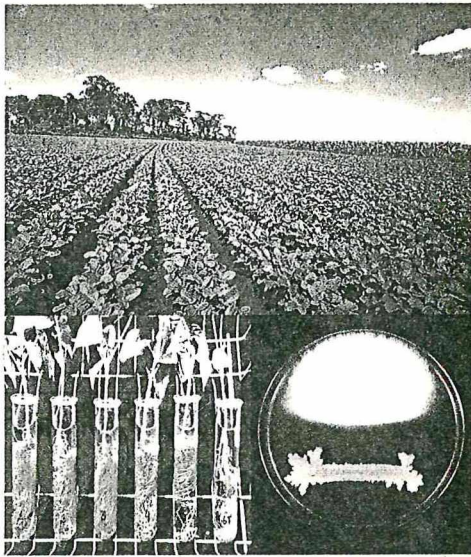


ECOLOGIA MICROBIANA



Editores

Itamar Soares de Melo

João Lúcio de Azevedo

Embrapa Meio Ambiente
Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:
Embrapa Meio Ambiente
Rodovia SP 340 – km 127,5 – Bairro Tanquinho Velho
Caixa Postal 69
13820-000 – Jaguariúna, SP
Fone: (019) 867-8700
Fax: (019) 867-8740
e.mail: edis@cnpma.embrapa.br

Produção gráfica: Regina Lucia Siewert Rodrigues
Franco Ferreira de Moraes
Normatização: Maria Amélia de Toledo Leme
Tiragem: 1.000 exemplares
Projeto gráfico e editoração eletrônica: Estúdio Graal

MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de, ed. Ecologia
microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998.
488p.

ISBN 85-85771-01-1

Inclui bibliografia

CDD-576.15

7

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA E SUA APLICAÇÃO EM ESTUDOS GENÉTICOS E ECOLÓGICOS

Maria Cléria Valadares-Inglis

EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia
Caixa Postal 2372, CEP 70770-900, Brasília, DF

Itamar Soares de Melo

EMBRAPA Meio Ambiente
Caixa Postal 69, CEP 13820-000, Jaguariúna, SP

INTRODUÇÃO

Com o advento da engenharia genética, tornou-se fundamental o investimento em métodos de extração de DNA em diferentes tipos de organismos, para viabilizar técnicas de caracterização, identificação e análise de variações gênicas, bem como em estudos populacionais e ecológicos. A obtenção de DNA permite análises de organismos selvagens e transgênicos, estudos de integração de genes transformantes, isolamento de genes homólogos e heterólogos, estudos de variabilidade genética de populações, bem como taxonomia de organismos. Aplicações da PCR (Reações da Polimerase em Cadeia) no melhoramento vegetal e de microrganismos, mapeamento de genes e avaliação da diversidade genética requerem métodos cada vez mais simples e confiáveis para isolamento de DNA, devido ao grande número de amostras que são analisadas nesses estudos.

Inúmeros métodos de extração têm sido desenvolvidos, sendo que,

idades celulares, em presença de gelo seco (nitrogênio líquido), com o auxílio de pistilo e mortar ou com processador de alimentos.

Após essa quebra, o DNA é liberado em um tampão de extração que normalmente contém detergentes, usualmente SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetilmetilamônio). A partir dessa etapa, o DNA deve ser protegido das nucleases endógenas, sendo para isso adicionado ao tampão outro detergente, EDTA (etilenodiaminotetraacético).

EDTA tem propriedades quelantes, ligando-se aos íons magnésio da suspensão, que são geralmente considerados co-fatores necessários à atividade das nucleases.

À mistura tampão/macerado celular é adicionado clorofórmio e/ou fenol, para desnaturação e separação de proteínas ligadas ao DNA. Nessas etapas, deve-se evitar agitações vigorosas, que podem causar quebras e/ou dobramentos do material genético. A extração deve ser feita com fenol neutralizado. Geralmente, as amostras são extraídas por adição de 1,0 volume de fenol neutralizado (com tampão TE, pH 7.5).

Ao término do isolamento, o DNA é normalmente coletado por processos de centrifugação e/ou aderência em superfícies como vidro, sendo então concentrado, lavado e suspenso em água ou tampões que permitem seu armazenamento.

Baseados nesses princípios, vários métodos vêm sendo desenvolvidos e otimizados, com o objetivo de minimizar o tempo de extração e obtenção de materiais de alta pureza. Diversos são os métodos em uso, e a escolha do protocolo depende do material a ser usado, isto é, plantas, fungos, bactérias, insetos e amostras de solo, bem como a aplicação do DNA, que vai requerer diferentes graus de pureza.

EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES TIPOS DE ORGANISMOS

Plantas

Métodos gerais podem ser usados para extrair o DNA de diferentes espécies de plantas, bem como de diferentes partes dessas. Assim, pode-se obter DNA de folhas, embriões, sementes etc. De acordo com Ferreira & Grattapaglia (1995), embora o DNA de amostras herbarizadas ou mesmo fósseis tenha sido isolado com sucesso, o uso de tecido novo, colhido na fase ativa de crescimento das plantas, geralmente apresenta melhores resultados. O objetivo principal é recuperar a quantidade

maxima
proteínas) outros inibidores de enzimas de restrição.

O processo de extração nesse tipo de organismo envolve basicamente a quebra da parede celular, até a obtenção de pó, em presença de gelo seco. Em alguns casos, areia esterilizada é adicionada à amostra para auxiliar a quebra. Adiciona-se ao pó coletado tampão CTAB' (cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 2x (2% w/x CTAB, 100 mM Tris pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl e 1% PVP, polyvinylpyrrolidone, Mr 40000). Adiciona-se um volume de clorofórmico/álcool isoamílico (24:1), mistura-se vigorosamente e centrifuga-se a 1100 g por 30 min. Coleta-se o sobrenadante em novo tubo e adiciona-se 1/10 volumes de 10% de CTAB (10% CTAB, 0,7 M NaCl) e mistura-se. Proceda-se nova extração com clorofórmio/álcool isoamílico. Ao sobrenadante adiciona-se igual volume do tampão de precipitação CTAB (1% CTAB, 50 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) e mistura-se vagarosamente. Após centrifugação, descarta-se o sobrenadante e ressuspende-se o precipitado em tampão TE (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 M NaCl). Adiciona-se dois volumes de etanol 100% e mistura-se vagarosamente. Centrifuga-se por 5 a 15 minutos e descarta-se o sobrenadante. Lava-se o precipitado com etanol 80% e centrifuga-se por 5 minutos. O precipitado é então seco por 20 a 30 minutos ou até o líquido evaporar. Reidrata-se o precipitado com 0.1 x TE (1 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA pH 8.0). Trata-se com RNase quando necessário (Rogers & Brandich, 1988).

A eficiência desse e de outros métodos de extração está relacionada ao uso de partes específicas de plantas, contendo diferentes concentrações de nucleases. De acordo com Rogers & Brandich (1988), DNA isolado da base de folhas de trigo apresenta dois tipos de nucleases, um tipo estimulado por magnésio e outro por EDTA.

Outra observação importante refere-se à presença de fortes colorações em DNAs extraídos de alguns tecidos, o que muitas vezes os torna resistentes a enzimas de restrição. Nesse caso, a adição de PVP no tampão de extração é recomendada, uma vez que PVP inibe a atividade de fenoloxidase. O uso de metanol contendo 0,1% de mercaptoetanol também é recomendado, no caso de tecidos de plantas contendo grandes quantidades de resinas ou compostos fenólicos, os quais interferem na solubilização do DNA (Möller *et al.*, 1992).

*CTAB é um potente inibidor da enzima Taq DNA polimerase. No caso de DNA para PCR, recomenda-se diluir CTAB ou omitir do tampão de extração.

O uso de técnicas de PCR e RAPD para análise de populações tem levado à busca de métodos simplificados de extração de DNA, uma vez que tais técnicas não requerem grandes fragmentos de DNA (ver capítulo sobre PCR neste volume). Assim, Guidet (1994) publicou um método simples baseado na quebra de tecidos de plantas em presença de proteinase K, EDTA e sarcosil, com posterior fervura da amostra por 5 minutos, para inativação da proteinase K, que pode afetar a *Taq* polimerase. O método consiste na quebra de tecidos, seguidos da adição de 100 μ l de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 0.45 M, proteinase K 1 mg/ml, SDS 1%). A mistura é incubada a 50°C por 1 hora e então diluída com 150 μ l de água. A 20 μ l desse extrato é adicionado 80 μ l de água, seguido de 10 μ g de RNase, sendo a mistura fervida por 5 minutos. Após poucos minutos à temperatura ambiente, 10 μ l dessa solução é diluída com 240 μ l de água. A solução final está pronta para uso em PCR, sendo usados 5 μ l em mistura com 15 μ l da reação de PCR. Mais recentemente, Steiner *et al.* (1995) publicaram um método ainda mais simples, sendo que a extração de amostras para uso em PCR é conduzida em um só tubo. Às amostras de tecidos macerados são adicionados 200 μ l de tampão de extração ROSE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 312.5 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS e 1% polyvinylporrolidone, PVP). Os tubos são vigorosamente agitados em vortex e incubados em fornos de hibridização a 90°C por 20 minutos, com agitação constante. A seguir, as amostras são incubadas em gelo por 5 minutos, para permitir a deposição de tecidos e PVP. Alíquotas são coletadas para diluição e amplificação. As diluições podem ser estocadas por vários meses a 4°C. Para PCR, 10 μ l do extrato original é diluído 170 vezes em água, sendo usados 2.5 μ l da diluição e reações cujo volume final seja de 12.5 μ l.

Procedimentos ainda mais simples de isolamento de DNA vegetal têm sido desenvolvidos para uso em PCR. Muitos desses funcionam somente para um número limitado de espécies ou tecidos. Sabe-se que tecidos vegetais variam em relação à facilidade com que o DNA pode ser isolado. A natureza da parede da célula quanto à composição e espessura, e a presença de polissacarídeos e metabólitos secundários podem influenciar o sucesso do processo de extração. O método de Berthomien & Myer (1991) emprega o tecido vegetal diretamente na mistura de PCR. No entanto, esse procedimento apresenta vantagem somente nos casos onde o PCR pode tolerar a presença de quaisquer outros componentes vegetais. Para preparar amostras de DNA, 0.1 g de tecido vegetal é adicionado a 100 μ l de tampão de extração contendo 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 1% SDS e 1% PVP. Os tubos são agitados em vortex e incubados em fornos de hibridização a 90°C por 20 minutos, com agitação constante. A seguir, as amostras são incubadas em gelo por 5 minutos, para permitir a deposição de tecidos e PVP. Alíquotas são coletadas para diluição e amplificação. As diluições podem ser estocadas por vários meses a 4°C. Para PCR, 10 μ l do extrato original é diluído 170 vezes em água, sendo usados 2.5 μ l da diluição e reações cujo volume final seja de 12.5 μ l.

Henry (1995) desenvolveram um método extremamente simples para preparação de DNA de muitas espécies vegetais, em que usam uma pequena quantidade de tecido vegetal aquecido em uma solução simples. O DNA presente no sobrenadante foi ideal para a maioria das aplicações da técnica de PCR, incluindo RAPD e PCR com "primers" específicos. O seguinte protocolo foi usado: a um tubo de microcentrifuga esterilizado contendo 20 μl de TPS (100 mM Tris HCl, pH 9.5, 1 M KCl, 10 mM EDTA), um pedaço de folha de 2 mm^2 ou 0.5 mg de pedaço de embrião foi adicionado e incubado a 95°C por 10 minutos. Uma alíquota de 1 μl do sobrenadante é usada diretamente na mistura de PCR ou proceder-se-á uma diluição, se inibidores estiverem presentes.

Bactérias

Vários são os métodos descritos para extração de DNA genômico de bactérias. Existem variações no que se refere às bactérias gram-positivas e gram-negativas. Recentemente, Lema *et al.* (1994) descreveram um método bastante simples que, com algumas etapas a mais, apresenta-se altamente eficiente para ambos os tipos de bactérias. Bactérias gram-positivas ou gram-negativas são coletadas (1 colônia ou 10 μl , o que corresponde a uma alçada) e ressuspensas em 100 μl de tampão TE (10 mM Tris-OH, 1 mM EDTA, pH 7.4), em tubos de eppendorf 1.5 ml. As gram-negativas não requerem nenhum outro tratamento, antes da adição do tampão de lise TESN (10 mM Tris-OH, 1 mM EDTA, 1% Sarkosil, 6 M NaI pH 7.4). No entanto, as bactérias gram-positivas devem ser centrifugadas por 5 minutos e ressuspensas em 200 μl de acetona. Após incubação em gelo por 5 minutos e à temperatura ambiente por mais 5 minutos, segue-se a centrifugação por 5 minutos. O precipitado é, então, secado a vácuo e ressuspendido em 100 μl de tampão TE contendo 2 mg/ml de lisozima e incubado por 1 hora a 37°C. O restante do processo é comum a todos os tipos de bactérias. Adiciona-se 300 μl do tampão de lise TESN à suspensão bacteriana e mistura-se por inversão. Incuba-se a 65°C por 5 minutos. Adiciona-se igual volume de isopropanol, agita-se vigorosamente e incuba-se por 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugando-se em seguida por 2 minutos. O precipitado é ressuspendido em 500 μl de isopropanol 40%. Após centrifugação, o precipitado é então lavado com 1 ml de ethanol 70%, recentrifugado, e o DNA secado a vácuo. Finalmente, o DNA pode ser armazenado em 100-200 μl e armazenado a 4°C.

Um rápido método de extração de DNA genômico bacteriano usando guanidina tiocianato foi descrito recentemente por Inglis (1995). Células crescidas por uma noite são coletadas em tubos eppendorf, 2.0 ml, centrifugadas e lavadas em tampão previamente gelado (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 M NaCl, pH 7.5). Ressuspender as células em 100 μ l de tampão TE. Lisar as células com 0.5 ml de GES, agitar e incubar à temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Resfriar em gelo e adicionar 0.25 ml de 7.5 M acetato de amônia, misturar e manter em gelo por 10 minutos. Adicionar 0.5 ml de clorofórmio/álcool etílico (24:1) e misturar vigorosamente. Centrifugar por 10 minutos a 1300 rpm. Transferir o sobrenadante para um tubo novo e adicionar 0.5 ml de 54 volumes de isopropanol frio. Inverter o tubo e centrifugar a 6500 rpm por 20 segundos. Lavar o DNA 5x com etanol 70% e finalmente lavar com 200 μ l de éter, tendo o cuidado de não perder o DNA precipitado. Secar e ressuspender em água ou tampão TE.

fungos Filamentosos

Diferentes laboratórios usam diferentes métodos para extração de DNA genômico de fungos adaptados ao número de amostras a serem analisadas, bem como sua aplicação, ou seja, dependendo do grau de pureza requerido, para uso em técnicas de Southern blot ou PCR. Basicamente, todos os protocolos utilizam micélio fúngico, podendo ser este liofilizado simplesmente congelado. A liofilização facilita o processo de quebra do micélio e permite que este seja mantido a temperaturas em torno de -80°C para uso posterior. O protocolo descrito por Raeder & Broda (1985) baseia-se no uso de micélio liofilizado. Cerca de 50 mg de micélio que se quebra é transferido para tubo eppendorf, adiciona-se 500 μ l de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) e mistura-se de forma a permitir a completa penetração do tampão no micélio. Adiciona-se 350 μ l de fenol e 150 μ l de clorofórmio, mistura-se, inverte-se e centrifuga-se por 1 hora a 13000 x g. O sobrenadante é então coletado e transferido para novo tubo eppendorf e tratado com 10 μ l de solução de RNase A (20 mg ml^{-1} em 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 15 mM NaCl, fervido por 10 minutos e estocado a -20°C) e incubado a 37°C por 10 minutos. A solução é extraída com igual volume de clorofórmio e centrifugada a 13000 x g por 10 minutos.

de isopropanol e mistura-se por inversão. O DNA precipitado pode ser visto e coletado com o auxílio de uma pipeta pasteur ou centrifugado. O precipitado é então lavado em álcool 70%, secado e ressuspendido em tampão TE ou água. A etapa de extração com clorofórmio/fenol deve ser repetida inúmeras vezes para a obtenção de DNA com maior grau de pureza. Outra variação do protocolo refere-se ao tempo de incubação com a RNase A, que pode ser prolongada por um período de 1 hora ou mais, para a completa remoção do RNA contaminante. A etapa de precipitação pode ser modificada, usando-se 10% do volume final de 3M acetato de sódio mais duas vezes e meia o volume de álcool. A vantagem desse método, apesar de trabalhoso, é a qualidade do DNA obtido, que pode ser facilmente digerido com enzimas de restrição.

Um método simplificado, menos trabalhoso que o anterior, foi desenvolvido por Lee & Taylor (1990) para o isolamento de DNA total, obtendo DNA de boa qualidade (Fig. 1) que pode ser amplificado a partir de pequenas quantidades de micélio fresco ou congelado a partir de amostras de herbário, particularmente basidiocarpos armazenados por 30 anos. A amplificação de tais amostras permite comparar a variabilidade genética presente em amostras coletadas muitos anos atrás com amostras de materiais recentes. Esse método tem funcionado para todos os membros de fungos examinados, incluindo os Oomicetos, Zigomicetos, Deuteromicetos, Ascomicetos e Basidiomicetos.

Outros protocolos para extração de DNA genômico de fungos filamentosos são descritos, sendo que muitos deles apresentam eficiência em termos de qualidade do DNA obtido e são mais simples. No caso de utilização para amplificação, o DNA não precisa apresentar alto grau de pureza, uma vez que seqüências genômicas de cópias únicas podem ser rotineiramente amplificadas a partir de 1 µg de DNA total (Saiki *et al.*, 1988). Se a seqüência-alvo está presente em cópias múltiplas, uma quantidade inicial bem menor, como 0,1 a 10,0 ng de DNA total é requerida. Ademais, a separação de genomas nucleares e de organelas não é necessária, pois a amplificação é dirigida pelo "primer" específico, e os "primers" podem ser sintetizados para amplificar frações de DNA de organelas ou seqüências genômicas. A amplificação via PCR de seqüências de rDNA de um único ascosporo de *Neurospora tetrasperma* foi alcançada por Lee & Taylor (1990). A amplificação de frag-

genética com espécies cujos esporos não podem ser germinados, ins protocolos reportam o uso de colunas de purificação como, por mplo, o método descrito por Cambareri & Kinsey (1993). O proto- baseia-se na quebra de micélio liofilizado, adição de 1 ml de tam- de extração (2 M NaCl, 0.4% deoxycolic acid-Sigma D6750, 1% Brij olyoxyrethylene 20 cetyl ether, Sigma P-5884) e incubação à tem- tura ambiente por 20 minutos. Centrifugar por 5 minutos a 13000 x letar o sobrenadante e transferir para tubo eppendorf contendo 1 le terra de diatomáceas (DE-Sigma D-5384) em 6M Guanidine cyanate (8.5 g de DE em 100 ml de Guanidine Thiocyanate); que

**PROTOCOLO DE LEE & TAYLOR
(1990)**

Lise de micélio macerado
20 a 60 mg) ou micélio fresco
(1% SDS, 1% 2-mercaptoetanol)*

incubar por 1h
a 65°C

fenol-clorofórmio

centrifugar

transferir o sobrenadante e adicionar
1 ml de 3 M NaOAc e 0,54 volumes
de isopropanol

misturar
suavemente

centrifugar por 2 min a 10000 xg
descartando em seguida
o sobrenadante

lavar o precipitado com álcool
70%, secar e ressuspender em TE

**PROTOCOLO DE RAEDER & BRODA
(1985)**

Lise de micélio macerado
(50 mg) (0,5% SDS)*

fenol-clorofórmio

centrifugar

tratar sobrenadante con RNase

incubar 37°C,
10 min

extrair com clorofórmio

centrifugar

adicionar ao sobrenadante
0,54 volumes de isopropanol

lavar o precipitado com álcool 70%,
secar e ressuspender em TE ou água

* solução de extração: 50 mM Tris-HCl, pH 7.2 50 mM EDTA 3% SDS 1%2-mercaptoetanol
 * solução de extração: 200 mM Tris-HCl pH 8.5 250 mM NaCl 25 mM EDTA 0.5% SDS

pode ser mantida em temperatura ambiente por até 6 meses. Incubar à temperatura ambiente por 3 minutos. Transferir para colunas (preparadas em seringas de 3 ml, com lâ de vidro siliconizada ou pré-fabricadas) e filtrar por aspiração. Lavar 3 vezes com 2 ml de isopropanol 80%. Aspirar por mais 20 minutos para secar o DE. Colocar as seringas em tubos de 15 ml contendo um tubo eppendorf na ponta para coleta do DNA. Adicionar 150 μ l de água destilada esterilizada e aquecida a 65°C. Centrifugar por 1 minuto a 13000 x g. Repetir o procedimento mais uma vez para coletar o DNA restante. De acordo com os autores, tal protocolo produz de 5 a 30 μ g de DNA de alta qualidade.

Variações envolvem principalmente alterações nos tampões de extração. De-Graaf *et al.* (1988) reportam um método utilizando tampão de extração TNS preparado pela adição de 1 ml de tri-isopropyl-naphthalene (TNS) (20 mg/ml), 1 ml de *p*-amonosalicylic acid (PAS) (120 mg/ml) e 0.5 ml 5x RNB (5x RNB contendo 121.1 g Tris, 73.04 g NaCl e 95.10 g EGTA por litro, pH 8.5).

Alguns autores reportam o isolamento de DNA a partir de protoplastos (Pfeifer & Khachatourians, 1989), o que facilita a liberação do material genético pela digestão da parede celular com enzimas hidrolíticas isoladas de *Trichoderma viride* e *Penicillium funiculosum*. No entanto, o referido protocolo requer a extração com fenol/clorofórmio, não apresentando, assim, nenhuma vantagem no que se refere à eficiência em termos de custos e tempo consumido no processo.

Protocolos desenvolvidos para células eucarióticas, de modo geral, podem ser aplicados na extração de DNA em fungos filamentosos. Métodos usados para plantas, como o descrito por Möller *et al.* (1992), que se baseia no uso de SDS/proteinase K para inativação de proteínas e CTAB aquecido, em presença de SDA e altas concentrações de sais, para precipitação de polissacarídeos, vêm sendo usados com sucesso em fungos.

Solos e Sedimentos

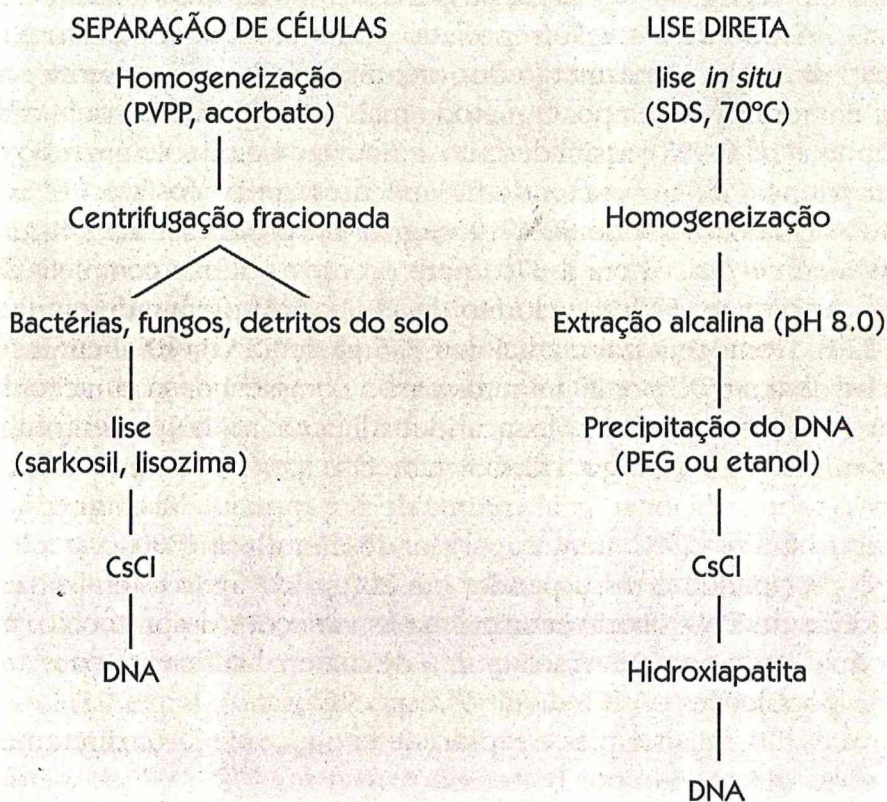
O solo possui uma população de microrganismos que pode ser analisada através de métodos moleculares, pela extração de DNA diretamente de amostras de solos e de sedimentos. A extração de DNA e posterior observação de amplificação por PCR oferece várias possibilidades de estudos ecológicos do ambiente terrestre, como, por exem-

solo (Giovannoni *et al.*, 1990; Schmidt *et al.*, 1991). O isolamento de los nucléicos a partir de amostras de ambiente naturais tem se mos-
lo uma ferramenta preciosa para detectar bactérias que não podem
cultivadas (Ward *et al.*, 1990), para determinar o destino de bacté-
seleccionadas ou genes recombinantes sob condições naturais (Steffan
Atlas, 1988), e revelar a diversidade genética e suas mudanças em
sistemas microbianos (Torsvik *et al.*, 1990). Devido à presença de
uras de compostos químicos complexos, a purificação de ácidos
éicos de solos e de sedimentos apresenta-se mais difícil do que a
ficação de DNA de culturas puras. Entretanto, tal procedimento
nrite uma análise da flora microbiana, seja via hibridização DNA-
, uso de técnicas como PCR, por seqüenciamento ou até mesmo
os métodos como RFLP, sendo que este último apresenta baixa es-
çidade principalmente por causa da quantidade de fragmentos de
produzidos pela digestão com enzimas de restrição, os quais são
ais de serem distinguidos (Saano *et al.*, 1995).

a geral, os métodos disponíveis para extração de DNA do solo são
rados e requerem grande tamanho das amostras, grandes quanti-
s de reagentes e uso de compostos orgânicos tóxicos. No caso de
para PCR, a amplificação pode ser inibida por contaminantes di-
de serem removidos do DNA extraído mesmo após vários passos
rificação (Steffan & Atlas, 1988). As células microbianas podem se
ortemente a colóides do solo, principalmente àqueles ricos em
ia orgânica e argilosos, dificultando a obtenção de produções su-
es de DNA de alto peso molecular. Extrações de DNA de solos e
entos sempre resultam em co-extração de substâncias húmicas
terferem na detecção de DNA. Esse tipo de contaminação pode
a Taq DNA polimerase em reações de PCR (Tsai & Olson, 1992),
rir na digestão de enzimas de restrição (Posteus & Armstrong,
reduzir a eficiência de transformação e especificidade na hibri-
o do DNA (Steffan & Atlas, 1988). Assim, desde que substâncias
is são difíceis de serem removidas, a purificação do DNA é uma
rítica para se obter um DNA com alto grau de pureza. A purifi-
le DNA de sedimentos marinhos tem sido difícil, dados os se-
problemas: resistência de bactérias à lise, encapsulamento em
s poliméricas complexas (DeFlaun & Mayer, 1983) e fraca recu-
o de DNA de fase sólida (Lorenz &

O uso de métodos moleculares na identificação de populações microbianas no solo baseia-se na lise das células e purificação do DNA microbiano por centrifugação diferencial. Esses métodos variam tanto em especificidade quanto em sensibilidade. Vários métodos são descritos, utilizando-se repetidas centrifugações, lise das células com detergentes catiônicos ou lisozima, separação e purificação de DNA com cloreto de césum e brometo de etídio, uso de resina para troca iônica, cromatografia de troca iônica e outros (ver revisão de Saano *et al.*, 1995).

Saylor *et al.* (1992) citam dois métodos gerais para extrair ácidos nucléicos de amostras ambientais, elaborados por Holben *et al.* (1988) e por Ogram *et al.* (1987), que incluem, respectivamente, a separação indireta de células e a própria extração com lise direta. A Fig. 2 sumariza as etapas destes processos.



Tsushima *et al.* (1995) descreveram o isolamento de DNA em amostras de solo, visando a identificação de microrganismos geneticamente modificados. Amostras de 1 g são misturadas com 0.5g de PVPP (polyvinylpyrrolidone) em tubos de centrífuga (30 ml). Adiciona-se 9 ml CaCl_2 (1%) e mistura-se vigorosamente por 1 minuto antes da incubação a 4°C por 1 hora. O sobrenadante das amostras deixadas para fermentação é então coletado em outro tubo e centrifugado a $6000 \times g$ por 10 minutos. O precipitado é, então, ressuspenso em 1% de CaCl_2 e colocado em tubo de centrífuga (39 ml) contendo 5 ml de sucrose (10% w/v). Após vigorosa agitação, adiciona-se 7.5 ml de sucrose (76%) e centrifuga-se por 10 minutos a $7500 \times g$. A fração superior é, então, coletada e transferida para novo tubo, ao qual se adiciona 18 ml de água destilada esterilizada. Centrifuga-se a $6000 \times g$ por 30 minutos e o precipitado obtido é, então, ressuspenso em 1 ml de água destilada esterilizada. A seguir, $500 \mu\text{l}$ da suspensão é usada para extração de DNA. O método de extração reportado pode também ser usado para extração direta, sem isolamento dos organismos, o que apresenta economia em termos de tempo. O método mais simplificado foi publicado por Saano *et al.* (1995), assim descrito: adicionar 1 g de solo em tubo de propileno (15 ml) contendo 2.5 ml do tampão fosfato (12 mM H_2PO_4 (pH 8.0), 1% de SDS, $100 \mu\text{g/ml}$ de proteinase K). Misturar e incubar por 1 hora a 37°C para promover a lise completa das células. Adicionar $450 \mu\text{l}$ de cloreto de sódio (5M) preparado em tampão CTAB. Homogeneizar e adicionar $375 \mu\text{l}$ de CTAB (10%) em 0.7 M NaCl . Incubar a 65°C por 20 minutos para a completa desnaturação das proteínas e liberação dos polissacarídeos ligados ao DNA. Centrifugar por 5 minutos a $9000 \times g$ a 4°C . Coletar a fase superior e transferir para novo tubo. Adicionar igual volume de isopropanol. Misturar e incubar por 1 hora a -20°C . Centrifugar por 15 minutos a $10000 \times g$ a 4°C . Coletar o precipitado e ressuspendê-lo em $200 \mu\text{l}$ de água esterilizada. A quantidade de DNA obtido acompanha as variações do protocolo, porém a qualidade permite o isolamento de material suficiente para análise de populações e/ou indivíduos específicos.

Um método mais simples e rápido de extração de DNA diretamente do solo foi sugerido por Porteus & Armstrong (1993). Esse método utiliza DNAs tanto de fungos como de bactérias, separados de outros componentes do solo por eletroforese em gel de agarose. Cinqüenta

mentos de rRNAs de 16S e 18S são amplificados via PCR com DNA extraído do solo. O método consiste em se coletar amostras de 20 mg de solo e agitar por 1 minuto em 400 μ l de tampão de extração (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS). Incubar à temperatura ambiente por 10-60 minutos, agitar em vortex por 1 minuto e centrifugar por 5 minutos a 12000 x g. Coletar 200 μ l do líquido sobrenadante e misturar com 200 μ l de isopropanol, incubando a mistura à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugando a 12000 x g por 5 minutos. O "pellet" é seco ao ar e suspenso em água. Aproximadamente 15 μ l desses extratos são submetidos a eletroforese para separar os DNAs de RNA, ácidos húmicos, taninos etc. Blocos de agarose contendo DNA são retirados do gel sob luz ultravioleta. Adiciona-se aos blocos de agarose igual volume de água, aquecendo-se a 65°C por 10 minutos. As misturas são novamente aquecidas a 65°C por 10 minutos, agitadas em vortex por 5 segundos e usadas para PCR. A vantagem desse método é que o DNA extraído na presença do gel de agarose pode ser amplificado sem qualquer adicional purificação.

Novos procedimentos foram incorporados por Lovell & Piceno (1994) para estabelecer métodos de lise direta, a fim de melhorar a qualidade do DNA recuperado de sedimentos. Preparação de DNA, recuperados de sedimentos de estuário foram incubados com acetato de amônia e brometo de etídio, extraído com fenol e as soluções aquosas de DNA precipitadas com isopropanol. Esses tratamentos reduziram significativamente a quantidade de contaminantes, mas não produziram DNA puro para digestão com enzima de restrição. Esse DNA parcialmente purificado foi de novo purificado usando cromatografia de troca iônica, produzindo DNA suscetível à digestão.

Extração rápida de DNA e rRNA de sedimentos foi proposta por Purde *et al.* (1996) utilizando-se coluna de hidroxiapatita (HTP), que tem sido usada como matriz de coluna de cromatografia de alta eficiência para separar ácidos nucleicos de proteínas. Nesse método, a coluna com HTP extrai, junto ou separadamente, DNA purificado ou rRNA a partir de amostras de sedimentos naturais, sem a necessidade de passos adicionais para rRNA, como a purificação enzimática. A grande vantagem de se isolar separadamente rRNA e DNA da mesma amostra é a possibilidade de avaliar a atividade metabólica relativa de uma comuni-

ários trabalhos têm sido relatados, com o objetivo de aumentar as recuperações de DNA proveniente do solo e sedimentos, usando tratamentos físicos como sonicação para lisar células de microrganismos genomas. Nesse tipo de extração, o DNA pode não ser adequado para análise de comunidades baseado em PCR-*Taq* DNA, devido à formação de produtos químicos com pouca quantidade de DNA "template" (Liesack, 1991).

Metódos

Metódos moleculares vêm sendo recentemente aplicados em estudos de populações de insetos, visando a identificação de polimorfismos genéticos em populações, incluindo mosquitos, gafanhotos, mosca branca e mosca doméstica, dentre outros (Haymer, 1994). O monitoramento da presença de insetos específicos, relacionados à resistência a inseticidas pelo uso de técnicas de PCR vem sendo usado com sucesso, como no exemplo de estudos relacionados com *Drosophila* sp. (Aronstein *et al.*, 1995). & Page Jr. (1992) estudaram os padrões de herança genética de microrganismos moleculares em abelhas haplodiplóides, através de técnicas de PCR. Para extração de DNA, foram usados insetos congelados em álcool e mantidos a -70°C . Os insetos foram então macerados em tubo de microcentrífuga, em presença do tampão CTAB. Amostras foram incubadas a 60°C por 2 horas e extraídas com clorofórmio/fenol. O DNA foi então precipitado com álcool absoluto e ressuspenso em tampão TE para uso em amplificação.

Estudos dessa natureza envolvem basicamente análise de DNA genômico, e para tanto são desenvolvidos e/ou adaptados métodos de extração de DNA. Métodos usados para plantas, microrganismos e sedimentos de solo apresentam grande eficiência quando aplicados a insetos. Estudos envolvendo populações de insetos utilizam um grande número de exemplares, sendo, portanto, aplicáveis os métodos convencionais. Entretanto, estudos que requerem o uso de indivíduos isolados exigem adaptações, uma vez que alguns insetos são de difícil coleta em número muito reduzido. Gawel & Bartlett (1993) estudaram diferenças genéticas em moscas brancas, usando métodos de extração de DNA de insetos adaptados. Indivíduos foram macerados com micropistilo em tubos de microcentrífuga de 1.5 ml. contendo 60 μl de tampão CTAB.

K). A solução de Tris-EDTA foi autoclavada antes da adição de Nonidet p-40 e proteinase K. Após a quebra do tecido, a mistura foi transferida para tubos eppendorf 0.5 ml e aquecida em termociclador por 15 minutos a 65°C, em seguida por 10 minutos a 95°C. A solução de DNA foi então dividida em alíquotas de 0.5 a 2.0 μ l que foram congeladas a -80°C para uso posterior. Método similar foi usado por Edwards & Hoy (1993) para estudos de parasitóides dos gêneros *Trioxys pallidus* e *Diglyphus begini*. Insetos adultos foram congelados a -80°C, em tubos eppendorf. Os tubos foram, então, imersos em nitrogênio líquido e macerados por 5 a 10 vezes com pistilo, também previamente congelados com nitrogênio líquido. Para cada espécie foram adicionados 200 μ l de 5% (p/v) de solução de Chelex (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Cada tubo foi descongelado por agitação vigorosa. Após essa etapa, os tubos foram colocados em termociclador e aquecidos a 56°C por 15 minutos, e então a 100°C por 4 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas (>100 g por 15 segundos), sendo o sobrenadante coletado cuidadosamente, para posterior uso em RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, ver capítulo sobre PCR nesse volume).

CONCLUSÕES

Inúmeros são os métodos a serem usados para extração de DNA genômico e pequenas alterações devem ser feitas em protocolos, visando a obtenção de DNA com as qualidades requeridas. Assim, métodos simples de extração podem ser adaptados, evitando-se o uso de técnicas de purificação, extremamente trabalhosas e que usam reagentes altamente tóxicos. Em alguns casos, como por exemplo a extração de DNA de bactérias, kits comerciais estão disponíveis e produzem grandes quantidades de material com metodologias bastante simples. Uma das grandes vantagens de se isolar DNA de amostras ambientais reside na detecção e recuperação de organismos não-cultiváveis ou de genes pobremente selecionáveis.

Nesse contexto, relatos disponíveis indicam que todas as formas de DNA podem ser recuperadas de amostras ambientais. É possível, portanto, desenvolver uma base molecular para determinar a complexidade genética para comunidades microbianas, a abundância quantitativa de

Extração do Fenol

Recomendado usar fenol líquido, grau técnico, rejeitando-se fenol corado ou rosado ou amarelado e fenol cristalino. Esse deve ser redensificado para remover produtos de oxidação, que causam ligações cruzadas entre o DNA e a quebra de bandas de fosfodiéster. Na extração de DNA com a utilização de fenol, esse deve ser equilibrado a um pH entre 7.5 e 8.0. A neutralização pode ser feita com tampão TE, adicionando um volume igual de 10 mM Tris.HCl, pH 7.5-8.0, 1 mM EDTA, fase tampão (fase superior). Repetir a operação até que o pH da fase aquosa esteja entre 7.5 e 8.0. Armazenar a 4°C.

Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1)

Mistura usada para separação de proteínas de DNA. Adiciona-se 100 ml de fenol saturado em TE, 100 ml de clorofórmio, 4 ml de álcool isoamílico. Essa mistura deve ser armazenada em frascos escuros a 4°C por quatro semanas.

Quantificação do DNA Extraído

Técnicas mais empregadas e acuradas para medir a concentração de DNA são aquelas determinadas através de espectrofotômetro e fluorescência depois de corado o gel com brometo de etídio. O DNA em solução deve estar totalmente solubilizado e não pode estar precipitado com proteínas, fenol ou RNA. Uma alíquota de 25 µl das amostras de DNA é diluída em 475 µl de tampão TE. A mistura pode ser incubada a 37°C por um período de 10 a 15 minutos. Uma densidade óptica (DO) de absorbância de 1.0 corresponde a 50 µg/ml de DNA de fita dupla e 40 µg para DNA de fita simples ou RNA. Assim, a concentração de DNA na amostra em µg/ml = $DO_{260} \times \text{fator de diluição} \times 50$. A determinação da pureza é feita calculando-se a razão da DO a 260 e a 280 nm. Um valor da ordem de 1.8 (DO_{260}/DO_{280}) pode ser considerado como DNA puro. Equipamentos modernos são hoje usados para quantificação, como exemplo de fluorômetros e analisadores de imagem, permi-

RNAse

Mistura-se 100 µl de RNAse, 25 µl de 1 M Tris-HCl, pH 7.6 e 375 µl de água bidestilada. No processo de extração de DNA, uma grande quantidade de RNA é também precipitada, o que causa leituras espectrofométricas falsas no momento da quantificação do DNA isolado. Quando o DNA contaminado com RNA é digerido com endonucleases e submetido a eletroforese, o DNA é carregado adiante pelo RNA. A grande distância migrada resulta em uma subestimação dos tamanhos dos fragmentos de DNA. Assim, as amostras devem ser tratadas com RNAse a 37°C, aproximadamente, por tempo variável de 10 minutos a 1 hora. A RNAse deve ser aquecida antes do uso para eliminar qualquer contaminante de DNAse. A RNAse é removida através da extração com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARONSTEIN, K.; ODE, P.; FRENCH-CONSTANT, R.H. PCR based monitoring of specific *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) cyclodiene resistance alleles in the presence and absence of selection. **Bulletin of Entomological Research**, v.85, p.5-9, 1995.
- BERTHOLOMIEN, P.; MEYER, C. Direct amplification of plant genomic DNA from leaf and root pieces using PCR. **Plant Molecular Biology**, v.17, p.555-557, 1991.
- CAMBARERI, E.B.; KINSEY, J.A. An ultra-fast method of DNA extraction from *Neurospora*. **Fungal Genetics Newsletter**, v.40, p.22-23, 1993.
- DE FLAUN, M.F.; MAYER, L.M. Relationships between bacteria and grain surface in intertidal sediments. **Limnology and Oceanography**, v.28, p.873-881, 1983.
- DE GRAFF, L.; VAN DEN BROEK, H.; VISSER, J. Isolation and transformation of the pyruvate kinase gene of *Aspergillus nidulans*. **Current Genetics**, v.13, p.315-321, 1988.
- EDWARDS, O.R.; HOY, M.A. Polymorphism in two parasitoids detected using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. **Biological Control**, v.3, p.243-257, 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995, 220p.
- GAWEL, N.J.; BARTLETT, A.C. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. **Insect Molecular Biology**, v.2, p.33-38, 1993.
- GIOVANNONI, S.J.; BRITSCHGI, T.B.; MOYER, C.L.; FIELD, K. Genetic diversity in sargasso sea bacterioplankton. **Nature**, v.344, p.60-63, 1990.
- GUIDET, F. A powerful new technique to quickly prepare hundreds of plant extracts for PCR and RAPD analyses. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.1772-1773, 1994.
- HAYMER, D.S. Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. **Insect Molecular Biology**, v.3, p.191-194, 1994.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.703-711, 1988.

- ; TAYLOR, J.W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In: INNIS, et.al, eds. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.282-287.
- L.W.; BROWN, A.; CLAKINS, J.H. A general method for the extraction of DNA from bacteria. **Journal of Biological Methods**, v.19, p.167-172, 1994.
- ; W.; WEYLAND, H.; STACKEBRANDT, E. Potential risks of gene amplification by PCR as determined by DNA analysis of a mixed culture of strict barophilic bacteria. **Microbial Ecology**, v.21, p.191-198, 1991.
- C.R.; PICENO, Y. Purification of DNA from estuarine sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v.161-174, 1994.
- E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of olecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected tissues. **Nucleic Acids Research**, v.6115-6116, 1992.
- A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological Methods**, v.7, p.57-66, 1987.
- T.A.; KHACHATOURIANS, G.G. Isolation and characterization of DNA from the entomopathogen *Beauveria* sp. **Experimental Mycology**, v.13, p.392-402, 1989.
- L.A.; ARMSTRONG, J.L. A simple mini-method to extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification. **Current Microbiology**, v.27, p.115-118, 1993.
- J.; EMBLEY, T.M.; TAKII, S.; NEDWELL, D.B. Rapid extraction of DNA and rRNA from sediments by a hydroxyapatite spin-column method. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.3905-3907, 1996.
- J.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p.19-20, 1985.
- J.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. **Plant Molecular Biology Manual**, v.A6, p.988.
- TAS, E.; PIPPOLA, S.; LINDSTRÖM; VAN ELSAS, J.D. Extraction and analysis of microbial DNA from environmental samples. In: REVORS, J.T.; VAN ELSAS, J.D. (ed.), **Nucleic acids in the environment: methods and applications**. Springer Verlag, 1995. p.49-67. (Spinger Laboratory Manual).
- GELFANCE, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Directed enzymatic amplification with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.
- ; FLEMING, J.T.; APPLGATE, B.; WARNER, C. Nucleic acid extraction and analysis: detecting genes active in the environment. In: WELLINGTON, E.M.H.; VAN ELSAS, J.D., ed. **Genetic interactions of microorganisms in the natural environment**. London: Pergamon Press, 1992, p.237-257.
- M.; DE LONG, E.F.; PACE, N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene sequencing. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.4371-4378, 1991.
- ; FLESHER, B.; MANSFIELD, H.R.; MONTGOMERY, L. Use of phylogenetically based hybridization studies of ruminal microbial ecology. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.1079-1083, 1992.
- L.; ATLAS, R.M. DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in natural samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2185-2191, 1988.
- POKLEMB, C.J.; FJELLSTROM, R.G.; ELLIOT, L.F. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for RAPD analyses. **Nucleic Acids Research**, v.23, p.2569-2570, 1995.
- GOKOSOYR, J.; DAAE, F.L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.782-787, 1990.
- SON, B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for PCR chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2292-2295, 1992.
- ; HASEBE, A.; KOMOTO, Y.; CARTE, J.P.; MIYASHITA, K.; YOKOYAMA, K.; PICKUP, R.W. Detection of genetically engineered microorganisms in paddy soil using a simple and rapid "nestes" polymerase chain reaction. **Soil Biology and Biochemistry**, v.27, p.219-227, 1995.
- ; HENRY, R. Single Step method for the extraction of DNA from environmental samples.