

Escolha e padronização de um protocolo de hemólise de amostras para extração de RNA

Adriana Mércia Guaratini Ibelli¹; Andrea Roberto Bueno Ribeiro²; Juliana Roberta Torini de Souza³; Maurício Mello de Alencar⁴; Luciana Correia de Almeida Regitano⁴

¹Aluna de doutorado em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, adriana.ibelli@gmail.com;

²Aluna de pós-doutorado, Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo;

³Aluna de Graduação em Ciências Biológicas, Centro Universitário Central Paulista, São Carlos, SP;

⁴Pesquisador(a), Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Estudos de regulação da expressão gênica dependem de amostras de RNA de alta pureza e integridade. A maioria das coletas de amostras para esses estudos ocorre a campo e, em grande parte das vezes, em diferentes momentos do experimento, exigindo que o transporte, a estocagem e o isolamento do RNA sejam adequados para que material de boa qualidade seja obtido. Dessa maneira, os objetivos deste trabalho foram: testar soluções de hemólise existentes na literatura e verificar a qualidade do RNA extraído após o processamento das amostras em diferentes tempos do experimento. Foram utilizadas amostras de sangue provenientes da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Em um primeiro teste, dois protocolos de obtenção de leucócitos a partir de amostras de sangue total foram avaliados. No primeiro, as amostras foram mantidas em gelo e, então, transferidas para um tubo de 15 mL, em que se adicionavam 10 mL de tampão de hemólise contendo 10 mM de Tris.HCl pH 7,6, 5 mM de MgCl₂ e 10 mM de NaCl. A seguir, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 min a 3000 rpm, por 2 ou 3 vezes. No segundo teste, após a coleta, as amostras mantidas em gelo foram transferidas para tubo de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 2500 rpm a 4°C. Após descarte do plasma, a solução de hemólise contendo 0,1444M de NH₄Cl e 0,01M de NH₄HCO₃ foi adicionada, e as amostras foram agitadas vigorosamente, mantidas em gelo por cerca de 30 minutos e centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi descartado e essa etapa foi repetida uma vez. Em seguida, as extrações de RNA foram feitas seguindo o protocolo tradicional do reagente Trizol (Invitrogen). Após a escolha da melhor solução hemólise, foi realizado um segundo teste com amostras de sangue processadas 20 minutos, 1 hora, 4 horas e 8 horas após o horário inicial da coleta. Nos dois testes, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop, para verificar a qualidade e a quantidade do RNA, e após eletroforese gel de agarose 1%, para observar a integridade. Os resultados da eletroforese para o primeiro teste evidenciaram que o melhor método para obtenção de leucócitos foi com a solução de hemólise contendo NH₄Cl e NH₄HCO₃, já que não foi observada degradação das amostras de RNA. Os resultados obtidos no segundo teste mostraram que não houve diferença na integridade do RNA após eletroforese no intervalo de tempo de 20 minutos a 8 horas entre a coleta e o processamento das amostras, que foram sempre mantidas em gelo. O mesmo foi observado quando o RNA foi mensurado no espectrofotômetro, já que todas as amostras apresentaram razão 260/280nm maior que 1,9 e quantidades maiores que 20 µg. Pode-se dizer, então, que amostras de sangue podem ser mantidas em gelo até 8 horas antes de serem processadas para a extração de RNA.

Apoio financeiro: EMBRAPA, CAPES, FAPESP

Área: Genética / Reprodução Animal / Sanidade Animal / Melhoramento Animal