

Benefícios da cinética na obtenção de DNA com alto grau de pureza

| **Andressa Moreira de Souza**
Embrapa Agroindústria de Alimentos

RESUMO

A extração e a purificação de ácidos nucleicos a partir de diversas amostras experimentais (bactérias, fungos, tecidos vegetais e tecidos animais) é uma etapa fundamental para que se obtenha alta eficiência em aplicações moleculares. O método CTAB foi modificado em etapas para observação dos resultados em cada etapa. Os fatores cinéticos aplicados no presente estudo foram: aumento de concentração dos reagentes, colisão efetiva, superfície de contato, energia de ativação e afinidade química. À medida que a concentração aumenta, a frequência de choques entre as moléculas aumenta e a velocidade da reação também aumenta. A velocidade das moléculas aumenta o número de choques efetivos entre as moléculas, conseqüentemente, a velocidade da reação aumenta. Quanto mais facilmente as moléculas se chocam, mais rapidamente elas reagem. A aplicação dos princípios de cinética química associados à substituição de reagente orgânico, aplicando química verde, na extração de DNA apresentou resultados com alto grau de pureza e integridade, com razões de A260/A280 em torno de 2,00 e A260/A230 em torno de 2,20.

Palavras-chave: Extração de DNA, Cinética, Química Verde, Grau de Pureza.

■ INTRODUÇÃO

A extração de DNA é etapa primordial para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. Obtêm-se DNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, e existe uma infinidade de protocolos para este tipo de procedimento. A escolha do protocolo de extração de DNA dependerá de diversos fatores como: tipo de tecido a ser utilizado, grau de pureza e de integridade necessária para a aplicação em que o DNA será utilizado, como: PCR, sequenciamento, clonagem gênica, entre outros (BARTLETT & STIRLING, 2003). Basicamente, o processo de extração de DNA consiste em duas etapas. A primeira etapa é a extração propriamente dita e consiste no rompimento das membranas celulares e consequente exteriorização do DNA. A segunda etapa consiste na purificação do DNA em solução, ou seja, a remoção dos outros componentes celulares da solução (resíduos de membrana, proteínas e RNA) (ROMANO & BRASILEIRO, 1999). O rompimento das membranas celulares geralmente é feito com detergentes (SDS ou CTAB). A utilização de agentes que impeçam o DNA de se ligar nas outras moléculas, facilitando sua separação na segunda etapa do processo. Após esta etapa, deve-se separar o DNA dos outros componentes celulares, através da adição de substâncias que façam com que a solução torne-se heterogênea e que o DNA fique dissolvido em apenas uma das fases. Ocorrida a separação de DNA dos outros componentes celulares, procede-se a precipitação do DNA para garantir a máxima pureza do material. Utiliza-se, geralmente, álcool (etanol ou isopropanol), para precipitação do DNA, que em presença de cátions monovalentes, promove uma transição estrutural na molécula de ácido nucléico, resultando em agregação e precipitação (REGITANO & COUTINHO, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2003). As razões de pureza são chave para indicar o sucesso da extração do DNA ou RNA, principalmente por acusar contaminações com proteínas e compostos fenólicos. A pureza determina o quão representativa é a leitura obtida a 260nm em relação ao DNA presente naquela amostra (e, portanto, em relação ao valor calculado para a concentração de DNA). Uma absorvância alta a 260nm pode na realidade vir de uma alta contaminação com proteínas, por exemplo. O pH e a força iônica do diluente do DNA afetam o valor encontrado na razão de pureza. Soluções ácidas tendem a gerar razões 0.2-0.3 unidades a menos. O mesmo funciona para soluções básicas, que geram razões 0.2-0.3 unidades a mais. É importante se assegurar de que as amostras e o branco estejam em um mesmo pH e força iônica. A razão entre absorvâncias medidas a 260nm e 280nm é a forma mais conhecida de controle de qualidade de uma extração de DNA ou RNA. Falando de forma generalizada, o resultado da divisão expressa a proporção entre a quantidade de DNA e a quantidade de proteínas extraídos. Na prática, diversos métodos de extração utilizam compostos fenólicos, que acabam deixando resíduos e também absorvendo a 280nm. Os valores almejados são: ≥ 1.8 : aceito como DNA “puro” 2.0: aceito como RNA

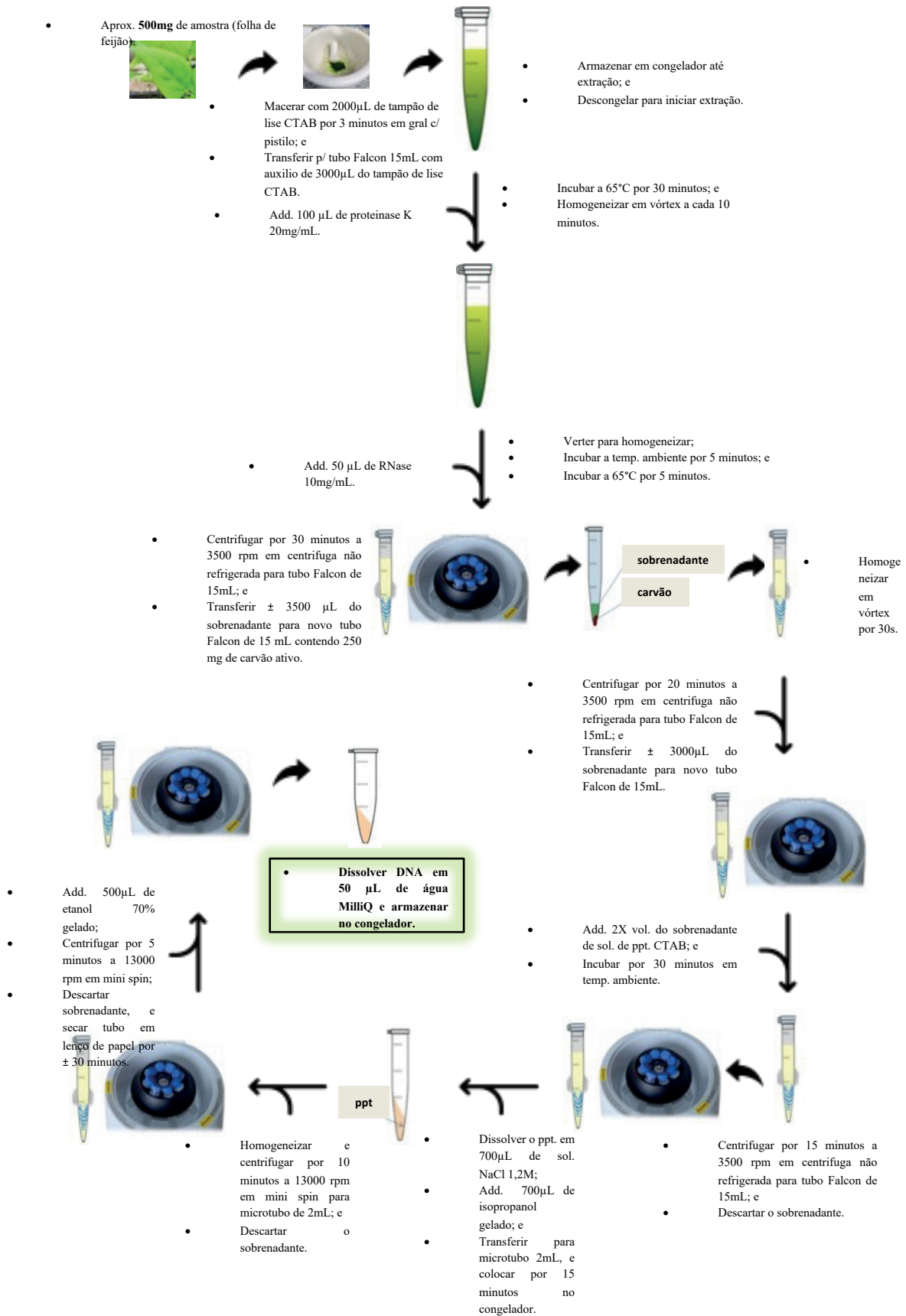
“puro”. Um pouco menos utilizada, ou menos conhecida, a razão 260/230 pode indicar contaminação com diversos compostos: fenóis, guanidina, carboidratos e proteínas. Os valores almejados estão geralmente entre 1.8 e 2.2, um pouco acima de seus respectivos valores 260/280 (THERMO SCIENTIFIC, 2009; 2012). A cinética química estuda as velocidades das reações, os diversos fatores que a influenciam, e explica a velocidade em termos dos fatores que a influenciam. Abrange tanto o estudo experimental das velocidades das reações, como o desenvolvimento de teorias propostas para explicar os resultados experimentais (CONSTANTINO, 2014).

■ MATERIAIS E MÉTODOS

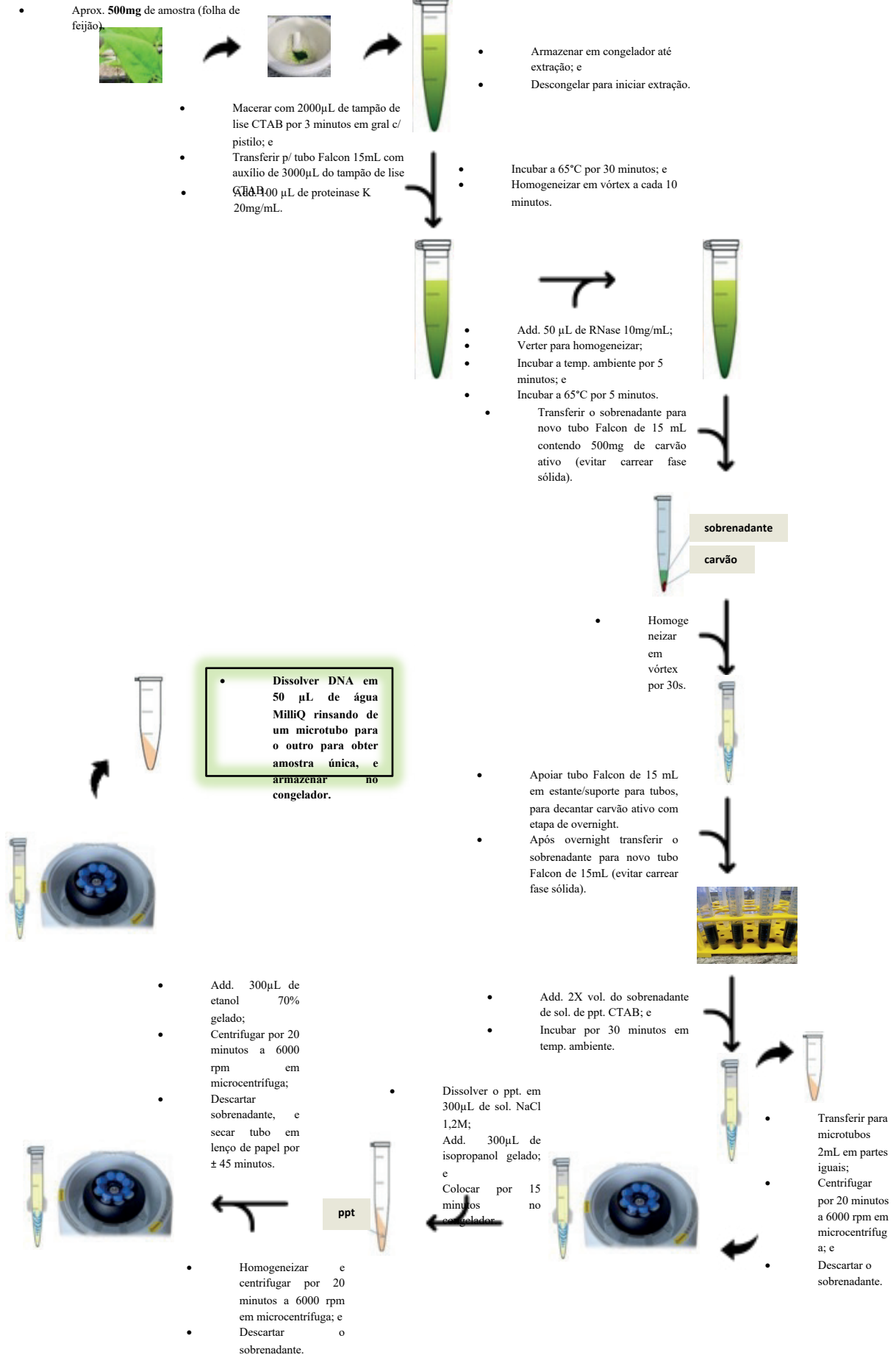
Método CTAB e CTAB modificado

No método CTAB utilizou-se 100mg de amostra e microtubos, enquanto no método CTAB modificado utilizou-se 500mg de amostra e tubo falcon, sendo ambos com clorofórmio. Os fluxogramas 1, 2 e 3 indicam as modificações aplicadas em cada método.

Fluxograma 1. CTAB modificado (carvão).



Fluxograma 2. CTAB modificado carvão (6000rpm).



Fluxograma 3. CTAB modificado carvão (13000rpm).

- Aprox. 500mg de amostra (folha de feijão).



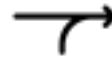
- Macerar com 2000µL de tampão de lise CTAB por 3 minutos em gral c/ pistilo; e
- Transferir p/ tubo Falcon 15mL com auxílio de 3000µL do tampão de lise CTAB.
- Add. 100 µL de proteinase K 20mg/mL.



- Armazenar em congelador até extração; e
- Descongelar para iniciar extração.



- Incubar a 65°C por 30 minutos; e
- Homogeneizar em vórtex a cada 10 minutos.



- Add. 50 µL de RNase 10mg/mL; Verter para homogeneizar;
- Incubar a temp. ambiente por 5 minutos; e
- Incubar a 65°C por 5 minutos.



- Transferir o sobrenadante para novo tubo Falcon de 15 mL contendo 500mg de carvão ativo (evitar carrear fase sólida).

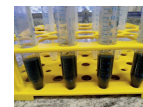


sobrenadante
carvão

- Homogeneizar em vórtex por 30s.



- Apoiar tubo Falcon de 15 mL em estante/suporte para tubos, para decantar carvão ativo com etapa de overnight.
- Após overnight transferir o sobrenadante para novo tubo Falcon de 15mL (evitar carrear fase sólida).



- Add. 2X vol. do sobrenadante de sol. de ppt. CTAB; e
- Incubar por 30 minutos em temp. ambiente.



- Transferir para microtubos 2mL em partes iguais;
- Centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm em mini spin; e
- Descartar o sobrenadante.

Dissolver DNA em 50 µL de água MilliQ rinsando de um microtubo para o outro para obter amostra única, e armazenar no congelador.



- Add. 300µL de etanol 70% gelado;
- Centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm em mini spin;
- Descartar sobrenadante, e secar tubo em lenço de papel por ± 60 minutos.



- Homogeneizar e centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm em mini spin; e
- Descartar o sobrenadante.



- Dissolver o ppt. em 300µL de sol. NaCl 1,2M;
- Add. 300µL de isopropanol gelado; e
- Colocar por 15 minutos no congelador.



■ RESULTADOS E DISCUSSÃO

A remoção da etapa de clorofórmio foi essencial para estabelecer um protocolo mais limpo (verde). O CTAB modificado foi testado com clorofórmio e carvão. Os resultados de quantificação de DNA das extrações com carvão apresentaram resultados mais elevados e mais limpos, como observado nas razões de 260nm/280nm e 260nm/230nm, sendo essas, melhores do que as do protocolo CTAB original, como descrito abaixo na tabela 1. A quantidade de carvão foi variada dentro dos métodos descritos nos três fluxogramas, para observar a influência da cinética nos resultados.

Tabela 1. Métodos CTAB's com as alterações e resultados.

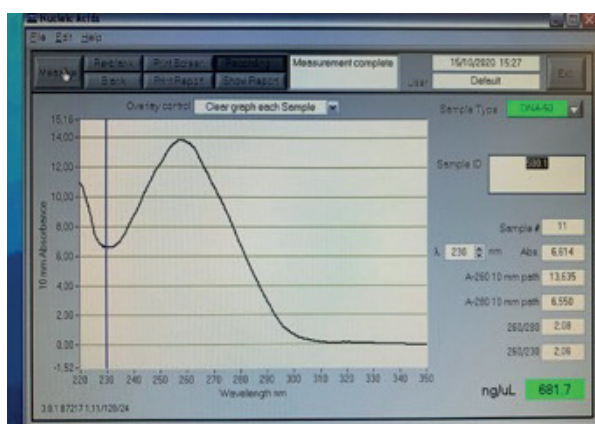
CTAB			
Amostra	[DNA ng/μL]	260nm/280nm	260nm/230nm
100-1	127,2	1,99	3,30
100-2	68,4	1,90	4,08
100-3	101,3	2,00	3,17
100-4	96,5	1,99	3,39
100-5	87,4	2,02	3,15
100-6	104,6	2,01	3,27
CTAB modificado carvão			
Amostra	[DNA ng/μL]	260nm/280nm	260nm/230nm
500-1 carvão	681,7	2,08	2,06
500-2 carvão	893,9	2,04	2,15
CTAB modificado			
Amostra	[DNA ng/μL]	260nm/280nm	260nm/230nm
500-3 clorofórmio	432,9	2,09	2,57
500-4 clorofórmio	353,4	2,04	2,57
CTAB modificado (13000rpm) carvão 150 mg			
Amostra	[DNA ng/μL]	260nm/280nm	260nm/230nm
500-5 carvão	712,0	2,03	2,34
500-6 carvão	650,0	2,01	2,41
CTAB modificado (13000rpm) carvão 500 mg			
Amostra	[DNA ng/μL]	260nm/280nm	260nm/230nm
500-7 carvão	204,8	2,02	2,09
500- 8 carvão	153,0	2,08	2,04
CTAB modificado (6000rpm) carvão 250 mg			
Amostra	[DNA ng/μL]	260nm/280nm	260nm/230nm
500-9 carvão	678,6	2,02	2,17
500-10 carvão	689,0	2,03	2,15
CTAB modificado (6000rpm) carvão 500 mg			
Amostra	[DNA ng/μL]	260nm/280nm	260nm/230nm
500-11 carvão	207,6	2,02	2,19
500-12 carvão	576,0	2,14	2,27

A tabela 1 evidencia que o CTAB modificado carvão apresenta boa repetibilidade, além de apresentar duas vantagens significativas: não utilizar clorofórmio (reagente de difícil

acesso, por ter compra controlada pela Polícia Federal) e não conter etapa de overnight, o que impacta diretamente no tempo de resposta do resultado da análise. De acordo com a Lei 10.357/2001, a Polícia Federal é responsável pelo controle e fiscalização de todos os produtos químicos que possam ser utilizados como insumo na elaboração de substâncias entorpecentes, psicotrópicas ou que determinem dependência física ou psíquica.

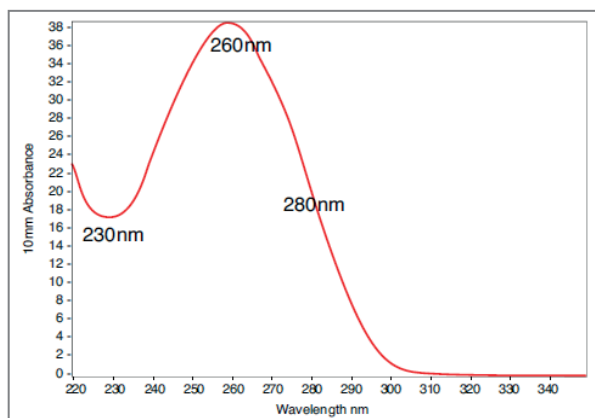
O uso da cinética como ferramenta de melhoria no método de extração de DNA foi observado com a aplicação de: aumento de concentração dos reagentes, colisão efetiva, superfície de contato, energia de ativação e afinidade química, utilizando os parâmetros (100mg e 500mg de amostra; 6000rpm e 13000rpm de velocidade de centrifugação; 100mg, 250mg e 500mg de carvão; e 500mg de amostra com clorofórmio). De acordo com a tabela 1, apresentada anteriormente, os CTAB modificado carvão e CTAB modificado 6000rpm (250mg de carvão) apresentaram resultados de alto grau de pureza, como demonstrado no espectro de comprimento de onda na figura 1. Nos resultados descritos na tabela 1, também podemos observar que, o incremento de carvão acima de 250mg não resultou em incremento na concentração de DNA e nem em melhora do grau de pureza, como observado quando o clorofórmio foi substituído pelo carvão.

Figura 1. Espectro do comprimento de onda da quantificação do CTAB modificado com carvão e as razões 260/280 e 260/230 do equipamento Nanodrop™ 2000.



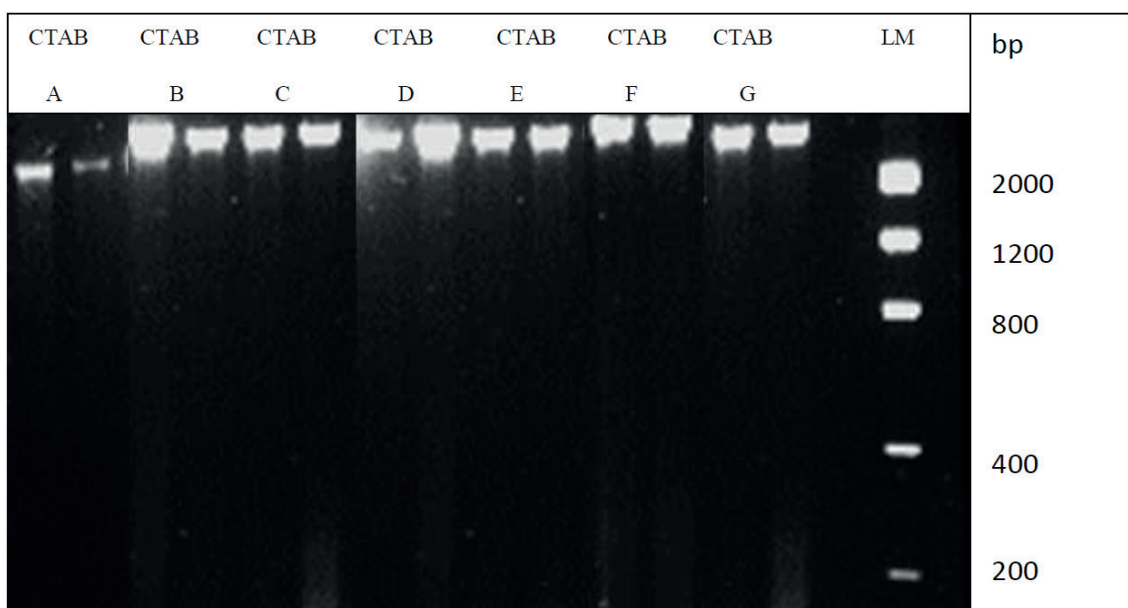
A varredura espectral geralmente é feita entre 220 e 350nm, com resolução de 2 a 5nm, tendo um perfil de espectro esperado, para amostras com DNA purificado, como demonstrado na figura 2.

Figura 2. Espectro de absorbância esperado para leitura de DNA purificado de 220 a 350nm (THERMO SCIENTIFIC, 2009).



O DNA genômico obtido das extrações foi submetido à análise de eletroforese em gel de agarose, para verificar a integridade dos DNA's extraídos, como podemos observar na figura 3.

Figura 3. DNA genômico submetido à eletroforese em gel de agarose para observar a integridade do DNA extraído. Métodos: A- CTAB original; B- CTAB modificado carvão; C- CTAB modificado clorofórmio; D- CTAB modificado 13000rpm (150mg carvão); E- CTAB modificado 13000rpm (500mg carvão); F- CTAB modificado 6000rpm (250mg carvão); G- CTAB modificado 6000rpm (250mg carvão). LM: low mass; bp: pares de base.



■ CONCLUSÃO

A aplicação dos princípios de cinética química na extração de DNA apresentou resultados com alto grau de pureza e integridade, com razões de A_{260}/A_{280} em torno de 2,00 e A_{260}/A_{230} em torno de 2,20 para os métodos modificados onde o carvão foi aplicado. Foi observado que o excesso de carvão não melhora a eficiência da extração. Os métodos com 250mg de carvão apresentaram alto grau de pureza e concentração. Os métodos CTAB modificado e CTAB modificado 6000rpm (250mg carvão) são equivalentes em resultados,

porém no segundo utiliza-se menos equipamentos e etapas de centrifugação. Dessa forma, conclui-se que a aplicação de cinética na extração influencia na qualidade do DNA extraído.

■ REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. de O., FELIPE, M.S.S., BRÍGIDO, M. de M. Técnicas Básicas em Biologia Molecular. Brasília: UnB; 2003.

BARTLETT, J.M.S., STIRLING, D. Methods in molecular biology. Vol 226. PCR Protocols. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc.; 2003.

CONSTANTINO, M. G.; da Silva G. V. J.; DONATE, P. M. Fundamentos de Química Experimental. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2014.

Polícia Federal. LEI Nº 10.357, DE 27 DE DEZEMBRO DE 2001.

REGITANO, L.C. de A.; COUTINHO, L.L. Biologia molecular aplicada à produção animal. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.180-186.

ROMANO, E. & BRASILEIRO, A.C. M. 1999. Extração de DNA de plantas. Biotecnologia 9:40-43.

THERMO SCIENTIFIC. T042 - TECHNICAL BULLETIN. NanoDrop Spectrophotometers 260/280 and 260/230 Ratios. Rev 3/2009.

THERMO SCIENTIFIC. T123 - TECHNICAL BULLETIN. Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios. T123– Rev 1/2012.