

Quantificação e Pureza do DNA de Videira por Meio de Espectrofotometria

Roberta Samara Nunes de Lima¹, Patrícia Coelho de Souza Leão², Carlos Antônio Fernandes Santos²

Resumo

Neste trabalho, são apresentados valores estimados da quantificação de DNA por espectrofotometria de 219 cultivares procedentes da coleção de Germoplasma de Videira da Embrapa Semi-Árido, localizada no Campo Experimental de Mandacaru, em Juazeiro-BA. O DNA genômico total foi isolado de folhas verdes e saudáveis, segundo protocolo 500 mM Tris pH 8,0, 1,4 M NaCl, CTAB 2% (p/v), 0,2 % beta-mercaptoetanol, 20 mM de EDTA. A quantificação por espectrofotometria foi determinada medindo-se a absorbância a 260 nm, considerando-se 1 DO = 50 ng/ μ L de DNA e por uma curva de regressão ajustada aos valores de absorbância de amostras de DNA de concentrações conhecidas. A determinação do grau de pureza, por sua vez, foi obtida, pela razão entre as leituras A_{260}/A_{280} sendo desejada um valor próximo de 1,8. As concentrações de DNA obtidas variaram de 47,97 à 1451,09 pela curva de regressão e de 86 a 984,0 ng/ μ L pela equação 1 DO = 50 ng/ μ L. As estimativas do grau de pureza das amostras, obtidas pela razão entre as leituras à 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), resultaram em valores que variaram de 1,14 à 2,19. As concentrações de DNA e o grau de pureza obtido foram satisfatórios para 66% das amostras analisadas, demonstrando a adequação do método de extração utilizado.

¹Bolsista CNPq, Embrapa Semi-Árido, Cx. Postal 23, 56302-970 Petrolina-PE. roberta@cpatsa.embrapa.br; ²Engo Agro, Pesquisador da Embrapa Semi-Árido. patricia@cpatsa.embrapa.br, casantos@cpatsa.embrapa.br.

Introdução

Sabe-se que o genoma da videira é relativamente pequeno, quando comparado a outras espécies perenes, e acreditava-se que isso poderia facilitar os estudos em genética molecular (Lodhi et al., 1994). Porém, a extração de DNA de videira é bastante delicada, devido à presença de contaminantes, como polifenóis e polissacarídeos, e para obtenção de bons resultados em análises como RAPD, AFLP ou qualquer outro tipo de estudo molecular, o DNA deve apresentar alta pureza.

A possibilidade de analisar indivíduos vai depender inicialmente da capacidade de extrair seu DNA em qualidade e quantidade adequadas de forma rápida e eficiente (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A utilização de DNA altamente puro é de fundamental importância, sobretudo em técnicas moleculares que utilizam enzimas de restrição, como o AFLP, garantindo que o DNA seja completamente digerido por estas enzimas. O DNA de baixa qualidade resulta em digestão incompleta, gerando fragmentos parciais, que quando amplificados produzem bandas alteradas que podem ser interpretados como falsos polimorfismos.

A fluorimetria, espectrofotometria e análise comparativa em géis corados com brometo de etídio são técnicas empregadas para a quantificação de DNA. A quantificação por espectrofotometria é determinada medindo-se a absorbância a 260 nm, considerando-se 1 DO = 50 µg/mL de DNA (Sambrook et al., 1989) ou obtendo-se uma curva de regressão ajustada aos valores de absorbância de amostras de DNA de concentrações conhecidas. A determinação do grau de pureza, por sua vez, é obtido pela razão entre as leituras A_{260}/A_{280} e deve estar próximo de 1,8.

O objetivo do presente trabalho foi determinar as concentrações de DNA e o grau de pureza por meio de espectrofotometria UV/Vis.

Material e Métodos

Utilizaram-se folhas jovens de 219 cultivares procedentes da coleção de Germoplasma de Videira da Embrapa Semi-Árido, localizada no Campo Experimental de Mandacaru, em Juazeiro-BA. O DNA genômico total foi isolado de folhas verdes e saudáveis, segundo protocolo de Lodhi et al. (1994) (500 mM Tris pH 8,0; 1,4 M NaCl; CTAB 2% (p/v); 0,2% beta-mercaptoethanol; 20 mM de EDTA).

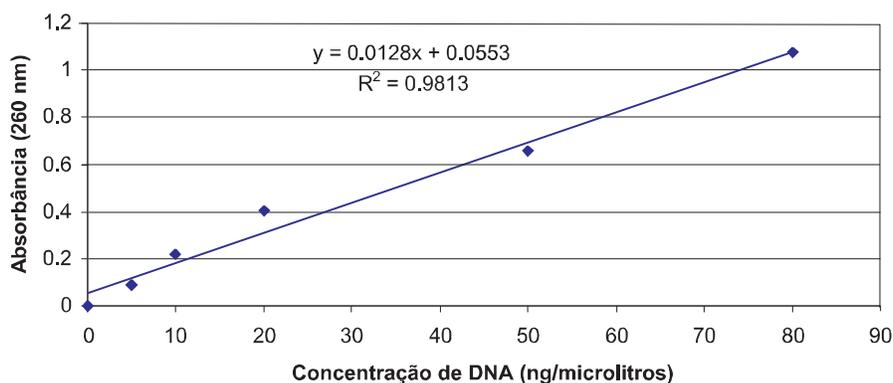
Após a extração do DNA foram diluídas 25 μ L da solução de DNA em 450 μ L de TE (Tris-HCl pH 8,0; EDTA 5M). A determinação da pureza e a estimativa de sua concentração foi realizada em espectrofotômetro FEMTO modelo 482, medindo-se a absorvância em contraste com uma amostra de TE na faixa do ultra-violeta à 260 e 280 nm.

As concentrações foram estimadas por duas formas de cálculo, utilizando-se a relação 1 DO= 50 nm/ μ L de DNA (Sambrook et al., 1989) e de acordo com a curva de regressão, através da utilização de DNA de concentrações conhecidas. O grau de pureza foi estabelecido através da razão A_{260}/A_{280} .

Resultados e discussão

Uma equação linear foi ajustada às leituras de absorvância à 260 nm de cinco amostras de DNA de concentrações conhecidas (5, 10, 20, 50 e 80 ng/ μ L) (Figura 1), obtendo-se um coeficiente de determinação (R^2) de 0,98, o que indica um bom ajuste dos pontos à equação linear. As concentrações de DNA foram obtidas, substituindo os valores de leitura A_{260} de cada amostra na equação $y = 0.0128x + 0.0553$, multiplicando-se pelo fator de diluição (FD = 20). As concentrações de DNA obtidas por este método variaram de 47,97 à 1451,09 ng/ μ L.

Figura 1 - Curva linear ajustada dos valores de leitura de absorvância à 260 nm em espectrofotômetro, a concentrações de DNA padrão.



Os valores de concentração obtidos pela equação proposta por Sambrook et al., (1989), onde: [] DNA (ng/ μ L) = (A₂₆₀ x 50 x FD/1000) x 1000, variaram de 86,00 à 984,00 ng/ μ L, sendo, em geral, inferiores àqueles obtidos pela equação de regressão linear.

As estimativas de concentrações de DNA de videira obtidas por espectrofotometria estão de acordo com aqueles observados por Costa (2004) e Silva (2002), utilizando a mesma espécie e protocolo de extração.

As estimativas do grau de pureza das amostras foram obtidas pela razão entre as leituras a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), resultando em valores que variaram de 1,14 a 2,19. 11,3% das amostras de DNA apresentaram valores de razão A_{260}/A_{280} inferiores a 1,6, e portanto, inferiores ao valor mínimo aceitável para reações de PCR, sendo recomendável repetir a extração do DNA dessas amostras. Por outro lado, 66% das amostras apresentaram razão A_{260}/A_{280} dentro de uma faixa aceitável entre 1,6 a 2,0, sendo que, valores próximos de 1,8 indicam DNA de elevada qualidade e 22,7% das amostras apresentaram relação A_{260}/A_{280} acima de 2,0. Valores menores que 1,8 de razão A_{260}/A_{280} podem indicar contaminação por proteínas, enquanto se esta razão for superior a 1,8, pode indicar contaminação por RNA (Turner et al., 1997).

Conclusão

As concentrações de DNA e o grau de pureza obtidos neste trabalho foram satisfatórios para a maioria das amostras, demonstrando a adequação do método de extração utilizado. No entanto, antes de se proceder às diluições para preparação das amostras de trabalho, recomenda-se confirmar os resultados pela quantificação em gel de agarose com amostras de concentração conhecida.

Agradecimentos

Apoio financeiro: BNB-Etene-Fundeci, CNPq/FACEPE

Referências Bibliográficas

COSTA, A. F. da. Avaliação de características agronômicas em variedades e de diversidade molecular em variedades, híbridos e espécies de videira. 2004. 95 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)-Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, Campos dos Goitacazes, RJ.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e AFLP em análise genética. Brasília, DF: EMBRAPA CENARGEN, 1995. 220 p.

SAMBROOK, J.; MANIATS, T.; FRITSH, C. F. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Sprig Harbos Laboratory, 1989.

SILVA, A V. C. da. Identificação de marcas moleculares ligadas à ausência de sementes em videira. 2002. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual Paulista, FCAV, Jaboticabal.

TURNER, P. C.; MCLENNAN, A. G.; BATES, A. D.; WHITE, M. R. H. Instants notes in molecular biology. Guildford Biddles, UK: 1997. 307 p.