

AValiação de Procedimentos de Isolamento e Purificação de DNA de Milho (*Zea mays* L.)

Manoel Teixeira Souza Júnior²
Edilson Paiva³

RESUMO

Foram avaliados 5 procedimentos de isolamento e purificação de DNA genômico de milho. O procedimento A, que utiliza N-lauroylsarcosine e Proteinase K, mostrou-se como o que mais se aproxima do ideal, porém, apresenta a utilização e 1 mg de Proteinase K por amostra como fator limitante. O uso de uma proteinase de amplo espectro se mostrou necessário ao processo de purificação de DNA.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: CTAB, RFLP, Proteinase K, marcadores moleculares.

INTRODUÇÃO

Atualmente, com o avanço do uso de marcadores genéticos, como a técnica e "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP), em programas de melhoramento de plantas, é importante considerar a maneira pela qual o DNA de planta será isolado e purificado, visto que a qualidade da mesma é de fundamental importância para a aplicação da técnica de RFLP a nível de laboratório.

Em alguns momentos, como na seleção massal em população de milho, uma única planta é representante de um material a ser selecionado em um processo de melhoramento. Isso leva à necessidade de um procedimento de isolamento e purificação de DNA que não exija o sacrifício da mesma, nem comprometa substancialmente a obtenção da sua progênie.

O DNA alvo, seja qual for a fonte, deve preencher um requerimento essencial, isto é, deve ser de alto peso molecular. O isolamento de DNA de alto peso molecular que seja adequado para a digestão com endonucleases de restrição pode ser um sério obstáculo ao processo de estudos a nível molecular em muitas espécies (KAISER & MURRAY, 1985 e DOYLE et alii, 1990).

É inevitável que se proceda a certo grau de quebra durante o isolamento do DNA genômico, devido ao choque mecânico durante o processo e à ação de enzimas degradativas liberadas durante a ruptura das células. Essas enzimas se encontram principalmente no citoplasma e, de uma maneira geral, os procedimentos descritos na literatura não se preocupam em separar

inicialmente o núcleo do restante da célula, exceto no descrito por DAVIS et alii (1986).

Os vegetais são particularmente notórios pela dificuldade de se trabalhar com eles em alguns procedimentos de isolamento de DNA, principalmente pelas características inerentes à parede celular que envolve o protoplasma vegetal. Além do mais, um procedimento que trabalha com um grupo de plantas pode não ser satisfatório com outro, devido à diversidade encontrada entre as plantas e seus compostos secundários. Além disso, são desvantajosos quando se necessita isolar o DNA de um grande número de indivíduos. Os métodos que utilizam gradiente de CsCl (cloreto de cério) consomem tempo e são caros (DOYLE et alii, 1990).

Desde SAGHAI-MAROOF et alii (1984), alguns autores têm salientado o uso de procedimentos com CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide), os quais se caracterizam por serem relativamente baratos e por apresentarem alta produção de DNA a partir de pequena quantidade de tecido (HOISINGTON et alii, 1988; UMC RFLP MANUAL, 1989 e DOYLE et alii, 1990).

O objetivo deste trabalho foi avaliar procedimentos de isolamento e purificação de DNA de alto peso molecular visando a futuras aplicações da técnica de poliformismo de comprimento de fragmento de DNA (RFLP) no melhoramento do milho. O procedimento ideal é aquele que, partindo de pequena quantidade de tecido de uma única planta, gere uma grande quantidade de DNA de alto peso molecular, com baixa taxa de degradação e alto grau de pureza,

1 Trabalho desenvolvido como parte da dissertação de Mestrado do primeiro autor.

2 Engenheiro Agrônomo, MSc., CNPMF/EMBRAPA, Cx. Postal 007, CRUZ DAS ALMAS, BA.

3 Engenheiro Agrônomo, PhD., CNPMS/EMBRAPA, Cx. Postal 151, SETE LAGOAS, MG.

além de ser um procedimento rápido, simples e de baixo custo.

MATERIAL E MÉTODOS

● Preparo de amostras

Plantas com 30 dias, após a semeadura, foram liofilizadas (Continuous Freeze Dryer, New Brunswick Scientific C.O., Inc. Edison, N.J., USA) e imediatamente moídas em moinho Thomas Wiley Intermediate Mill, com malha 0,5 mm. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro com tampa e armazenadas a 20°C até o isolamento do DNA.

● Procedimentos utilizados

- HOISINGTON et alii (1988)

O DNA genômico foi extraído incubando 400 mg de tecido liofilizado e moído em 9 ml de tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,5 M; EDTA 0,1 pH 8,0; beta-mercaptoetanol 0,14 M e CTAB 1%), a 60°C durante 90 minutos. A purificação se deu adicionando 4,5 ml de clorofórmio: octanol (24:1), misturando durante 5 minutos por inversões suaves e centrifugando a 3000 rpm (2508-M05 Clay Adams Dynac Horizontal Rotor), por 10 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para outro tubo de ensaio e repetiu-se a purificação até que o mesmo se tornasse amarelo. Após a purificação, o sobrenadante, aproximadamente 5 ml, foi tratado com 50 microlitros de RNase A (10 mg/ml), por 30 minutos à temperatura ambiente. O DNA livre de RNA foi precipitado adicionando 6 ml de isopropanol a -20°C/e agitando por inversões suaves. Após a precipitação o DNA foi "pescado", utilizando uma pipeta de Pasteur, tendo a extremidade em forma de anzol, lavado em solução de etanol 76% com acetato de sódio 0,2 M durante 20 minutos à temperatura ambiente e em solução de etanol 76% com acetato de amônio 10 mM por 10 segundos à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em um microtubo contendo 1,0 ml de TE pH 7,5 (Tris 10 mM; EDTA 1 mM) e armazenado a 4°C até a sua utilização.

- UMC RFLP MANUAL (1989)

Esse procedimento é uma modificação do descrito acima. Após a precipitação do DNA, o mesmo foi ressuspenso em TE pH 7,5 à temperatura ambiente, por uma noite, sob lenta agitação. A seguir ele foi submetido a um novo processo de purificação com fenol equilibrado com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 e hidroxiquinolina 0,1%, conforme MANIATIS et alii (1982) e a um processo de purificação por mistura com clorofórmio:octanol (24:1). O DNA foi novamente precipitado adicionando 50

microlitros de NaCl 5 M e 2,5 ml de etanol 95% a -20°C. Após a precipitação, o DNA foi "pescado" e lavado como descrito em HOISINGTON et alii (1988).

- DOYLE et alii (1990)

O DNA genômico foi extraído, incubando-se 400 mg de tecido liofilizado e moído em 9 ml tampão de extração (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 1,4 M; EDTA 20 mM pH 8,0; beta-mercaptoetanol 0,02 M; CTAB 2%) a 65°C durante 30 minutos. A purificação foi realizada como a descrita no procedimento HOISINGTON et alii (1988). O sobrenadante, quando apresentava coloração amarela, foi transferido para outro tubo e os ácidos nucleicos foram precipitados, adicionando 6 ml de isopropanol a -20°C e misturando por inversões suaves. Após serem "pescados" foram lavados em 10 ml de etanol 76% com acetato de amônio 10 mM por pelo menos 20 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se então a secagem à temperatura e adição de 1 ml de TE pH 7,5. O tratamento com RNase A foi realizado adicionando-se 1 microlitro de solução estoque 10 mg/ml e incubando por 30 minutos a 37°C. O DNA foi então precipitado adicionando-se 2 volumes de tampão TE pH 7,5 ou dH₂O, acetato de amônio pH 7,7 para concentração final de 2,5 M e 2,5 volume de etanol 95% a -20°C. Após a precipitação, o DNA foi "pescado", seco por 15 minutos à temperatura ambiente, e ressuspenso em TE pH 7,5. Armazenado a 4°C até ser utilizado.

- Procedimento A

400 mg de tecido liofilizado e moído foram incubados em 9 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0; N-Lauroylsarcosine 0,5 % e proteinase K 1 mg, por 15 minutos a 65°C e por 12 horas a 37°C, sob agitação em mesa agitadora à rotação de 150 rpm. A purificação se deu com 4,5 ml de clorofórmio: álcool ioamílico (24:1) e centrifugação, sob as mesmas condições descritas em HOISINGTON et alii (1988). Os ácidos nucleicos foram precipitados adicionando ao sobrenadante 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M, 2 volumes de dH₂O e 20 ml de etanol 95% a -20°C. Seguindo-se à precipitação, os ácidos nucleicos foram "pescado" e incubados em etanol 76% + acetato de amônio 10 mM por pelo menos 20 minutos. Após a incubação, os ácidos nucleicos foram secos a vácuo por 15 minutos e ressuspenso em 4,5 ml de TE pH 7,5. O RNA foi degradado utilizando-se 10 microgramas/ml de RNase A durante 30 minutos a 37°C, e nova purificação se deu adicionando acetato de sódio para 0,3 M e igual volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado

adicionando-se 6 ml de etanol 95% a -20°C ; seguindo-se às lavagens descritas em HOISINGTON et alii (1988).

- Procedimento B

Esse procedimento foi uma adaptação do procedimento A, onde utilizou-se a solução de extração descrita em HOISINGTON et alii (1988).

● Quantificação e avaliação

A quantificação do DNA genômico é necessária para avaliar os procedimentos de isolamento e purificação utilizados, padronizar a quantidade de DNA dos diversos materiais a serem estudados, bem como viabilizar o uso adequado das endonucleases de restrição.

Dois foram os procedimentos de quantificação utilizados: espectrofotometria e uso de padrões de DNA de alto peso molecular. No primeiro procedimento utilizou-se uma característica que é inerente aos ácidos nucléicos, isto é, de absorver luz ultravioleta tão eficientemente que a absorbância óptica na faixa de 260 nm pode ser usada como medida rápida, precisa e não destrutiva de quantificação (MANIATIS et alii, 1982). O segundo procedimento utiliza padrões de DNA de alto peso molecular (DNA do fago lambda) com concentrações conhecidas para processar a quantificação através de comparação visual de intensidade de bandas em géis de agarose.

Os DNA's genômicos foram quantificados e, em iguais concentrações, eram avaliados quanto ao DNA de alto peso molecular, DNA degradado e teor de RNA presente nas amostras. Todas estas avaliações foram visuais, mediante observação do DNA em gel de agarose 0,6%, após corrida a 30 volts/16 mA/10 watts por 3 horas e coloração por 20 minutos em 500 ml de água destilada contendo 50 microlitros de brometo de etídio (10 mg/ml).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de tecido foliar, mesmo após um ano de armazenagem, apresentaram-se aptas para o isolamento e a purificação de DNA genômico. Esse tempo não influenciou na qualidade do DNA genômico isolado.

Conforme pode ser visto na Figura 1, os procedimentos HOISINGTON et alii (1988), UMC RFLP MANUAL (1989) e DOYLE et alii (1990) e procedimento B resultaram na obtenção de taxas maiores de DNA fragmentado e de contaminação com RNA, quando comparados com DNA isolado de *Rhizobium* sp e com DNA obtido pelo procedimento A.

O uso de detergentes fortes com agentes de lise (proteínase K) não somente liberam DNA mas, simultaneamente, agem como inibidores

de atividade de DNAses endógenas. Após a lise, a solução torna-se viscosa devido à presença de DNA de alto peso molecular. A partir desse estado avançado, é essencial que a quebra mecânica seja levada a um mínimo, isto é, processos como misturas, homogeneização, expulsão através de pipetas e agulhas de seringas devem ser evitados ao máximo (KAISER & MURRAY, 1985).

Uma fonte comum de quebra mecânica é o excesso de manipulação das soluções viscosas de DNA; especialmente quando os procedimentos demandam diversos ciclos de extração com fenol ou outros sorventes orgânicos (KAISER & MURRAY, 1985). O uso destes sorventes orgânicos se faz necessário quando da inativação e remoção de enzimas que são usadas em um dos diversos passos de purificação do DNA. Medidas adicionais, porém, são necessárias quando o DNA é purificado de misturas complexas de moléculas, isto é, de células lisadas. Neste caso é comum remover a maioria das proteínas por digestão com enzimas proteolíticas, como pronase e proteinase K, que são ativas contra um amplo espectro de proteínas nativas, as quais posteriormente são extraídas com sorventes orgânicos (MANIATIS et alii, 1982).

Embora o uso de detergentes fortes tenham inibido a atividade de DNAses endógenas liberadas com a lise, os resultados mostraram que só este fator não foi capaz de evitar a alta taxa de fragmentação resultante da ação destas DNAses endógenas, requerendo a adição de enzimas proteolíticas de amplo espectro e quelantes.

Todos os procedimentos foram rápidos, simples e com resultados repetitivos (Figura 2). O procedimento A apresentou uma alta eficiência de ação da RNase A, mesmo sendo usada em baixa concentração, se comparado aos procedimentos HOISINGTON et alii (1988) e UMC RFLP MANUAL (1989). O alto custo de proteinase K, visto que cada amostra exige 1 mg desta enzima, apresentou-se como único fator limitante ao uso desse procedimento.

Um outro ponto que convém salientar quanto ao material isolado pelo procedimento A, é a não degradação do DNA com o tempo, isto é, foi observado que todos os outros procedimentos levaram a um aumento da quantidade de DNA degradado durante o armazenamento a 4°C . Esse aumento da quantidade de DNA degradado deve-se provavelmente, às impurezas na solução com DNA, principalmente, quanto às DNAses endógenas e seus cofatores, porque esses procedimentos não sofreram tratamento com proteinase K.

Dos dois métodos de quantificação de DNA testados, espectrofotometria e DNA de alto peso

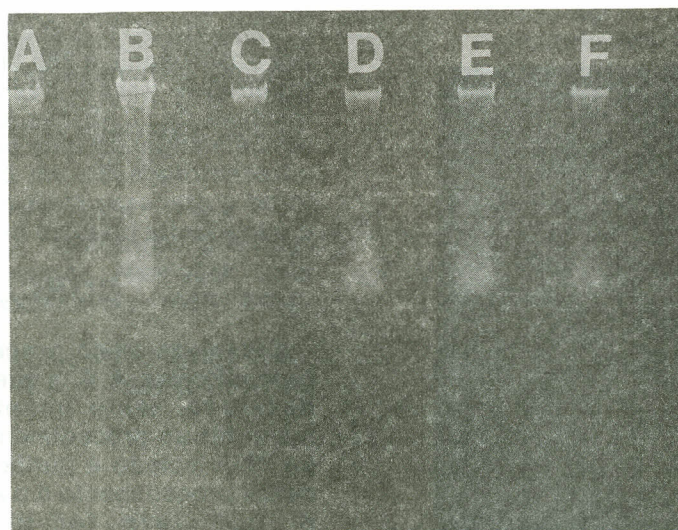


FIGURA 1. DNA de *Rhizobium* sp doado pela Professora Nadja Maria de Sá Carneiro da UFMG e utilizado como padrão de qualidade (A); DNA's de milho isolados pelo procedimento HOISINGTON et alii (1988) (B), procedimento A (C), procedimento B (D), procedimento DOYLE et alii (1990) (E) e procedimento UMC RFLP MANUAL (1989) (F).

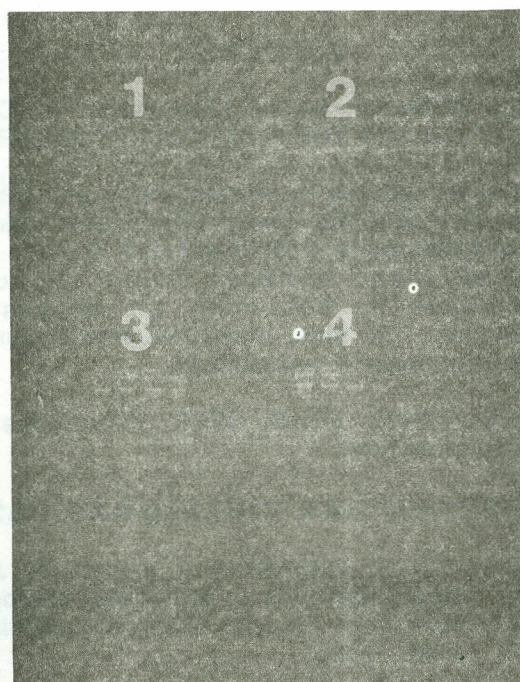


FIGURA 2. DNA's genômico isolados, com repetições. DNA's de milho isolados pelo procedimento UMC RFLP MANUAL (1989) (1), procedimento DOYLE et alii (1990) (2), procedimento A (3) e DNA *Rhizobium* sp (4) utilizado como padrão de qualidade.

molecular com concentração conhecida, esse último apresentou-se como procedimento mais confiável, tendo em vista que, além da quantificação do DNA de alto peso molecular, o mesmo possibilitou ter acesso a informações quanto ao DNA fragmentado e ao RNA.

O uso de espectrofotometria exige, para uma precisa quantificação do DNA de alto peso molecular, que a solução esteja pura, isto é, sem significante quantidade de contaminantes, tais como: proteínas, fenol, agarose, CTAB, fragmentos de DNA de fita simples e RNA. Como a espectrofotometria mede a quantidade de radiação ultra-violeta absorvida pela base nitrogenada constituinte do nucleotídeo (MANIATIS et alii, 1982), a mesma leva à quantificação superestimada, visto que, além do DNA de alto peso molecular, que é o único útil ao processo, ela quantifica os nucleotídeos livres, os fragmentos de DNA de fita simples, os fragmentos de DNA de fita dupla gerados durante o isolamento e a purificação e o RNA que porventura estejam na amostra.

A quantificação via comparação com padrões de DNA de alto peso molecular com concentrações conhecidas, embora seja bastante dependente da observação pessoal, possibilita considerar exclusivamente o DNA de alto peso molecular.

A Figura 3 apresenta o exemplo de um gel de agarose com oito padrões de DNA de alto peso molecular, com concentrações conhecidas de DNA e utilizadas para quantificar oito materiais com volume conhecido. Por exemplo, o DNA

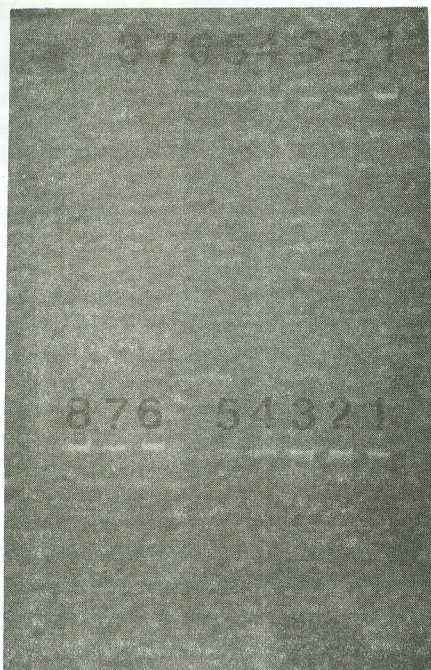


FIGURA 3. Padrões de DNA de alto peso molecular utilizados para quantificação de DNA genômico por comparação visual. No alto, da direita para a esquerda, padrões de DNA de fago lambda com 250 ng, 200 ng, 175 ng, 150 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng e 12,5 ng, respectivamente. No centro, da direita para a esquerda, DNA isolado pelo procedimento A (1 a 5) e DNA de *Rhizobium* sp utilizado como padrão de qualidade (6 a 8).

genômico número 1 mostra intensidade próxima da banda padrão correspondente a 175 ng; como o volume da solução com este DNA genômico foi de 3 microlitros, a concentração deste DNA, isolado pelo procedimento A, é aproximadamente 60 ng/microlitro.

Se por outro lado a espectrofotometria superestima a quantificação quando o DNA genômico tem alta taxa de degradação e/ou contaminação com RNA, por outro lado, observou-se que ela pode subestimar a quantificação quando a amostra tem somente DNA de alto peso molecular. Para tanto, tem-se como exemplo o mesmo DNA genômico número 1 da Figura 3, que apresentou uma concentração de 35 ng/microlitro pela espectrofotometria. Isso também foi observado com outros materiais do referido gel.

Segundo DOYLE et alii (1990), a quantificação por absorvância a 260 nm geralmente apresenta resultados irreais devido à interferência por resíduos de CTAB nas amostras. Esses autores também sugerem uma purificação adicional por ultracentrifugação em cloreto de cério, o que torna o processo mais caro, complexo e longo, o que não foi objetivo do nosso trabalho.

CONCLUSÃO

Dentre os cinco procedimentos avaliados, o procedimento A é o que mais se aproxima do desejado, tanto quanto às características inerentes ao procedimento, quanto às inerentes ao DNA isolado e purificado. A única limitação desse procedimento é o alto custo da proteinase K, que deve ser utilizada em grandes quantidades.

Para a quantificação de DNA genômico via espectrofotometria seja confiável, é necessário que a amostra apresente somente DNA de alto peso molecular. A quantificação, utilizando padrões de DNA de alto peso molecular com concentrações conhecidas, mostrou-se mais confiável que a espectrofotometria.

SUMMARY

EVALUATION OF MAIZE (*Zea mays* L.) DNA ISOLATION AND PURIFICATION PROCEDURES

Five procedures to isolate and purify maize DNA were studied. The procedure A - using N-lauroylsarcosine and Proteinase K - was the best of them; however, it use so much Proteinase K, becoming an expensive procedure.. The most pure DNA was obtained when Proteinase K was utilized.

INDEX TERMS: CTAB, RFLP, Proteinase K, molecular markers.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAVIS, L.G.; DIBNER, M.D. & BATTEY, J.F. **Basic Methods in Molecular Biology**. New York, Elsevier Science Publishing, 1986. 388p.
2. DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. & HORTORIUM, L.H.B. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Gaithersburg, 12(1):13-5, 1990.
3. HOISINGTON, D.; GARDINER, J. & GROGAN, R. **RFLP Procedures**. Missouri, University of Missouri, 1988. 29p. (Apostila).

4. KAISER, K. & MURRAY, N.E. The use of phage lambda replacement vector in the construction of representative genomic DNA libraries. In: GLOVER, D.M. **DNA Cloning/A practical approach**, Oxford, IRL Press, 1985. V.1, 201p.
5. MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. & SAMBROOK, J. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
6. SAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA Spacer-length Polymorphisms in Barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. In: PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE OF THE UNITED STATES OF AMERICA, Washington, 1984. V.18, p.8014-8.
7. UMC RFLP PROCEDURES MANUAL. **Manual RFLP Laboratory**. Missouri, University of Missouri, 1989. 41p. (Apostila).