

LIOFILIZAÇÃO COMO MÉTODO DE CONSERVAÇÃO DE RNA

Juliana Roberta Torini de Souza¹, Adriana Mércia Guarantini Ibelli², Luciana Correia de Almeida Regitano³

¹ Centro Universitário Central Paulista (UNICEP), São Carlos, SP, Bolsista CNPq

² PPGGEv- UFSCar, , São Carlos, SP, Bolsista CAPES

³ Pesquisadora do Centro de Pesquisa Pecuária do Sudeste, EMBRAPA, São Carlos, SP

Estudos sobre regulação da expressão gênica, processamento do RNA mensageiro e obtenção de moléculas de cDNA dependem de amostras substanciais de RNA em elevado grau de pureza e integridade. Diante de tais necessidades, a busca por métodos eficazes de extração e armazenamento dessas amostras tem se tornado constante. Existem hoje no mercado, reagentes que permitem a extração e a purificação de RNA de diversas amostras, com rapidez e eficiência, pois contêm simultaneamente em solução, tiocianato de guanidina, que está entre os desnaturantes de proteínas mais eficientes, e fenol/clorofórmio, solventes orgânicos que isolam o RNA do DNA e de proteínas. Outra preocupação na análise de RNA é a facilidade de degradação por ação enzimática. Uma alternativa para manutenção da integridade do RNA seria a liofilização, que é o método mais indicado para a conservação de produtos orgânicos. O processo baseia-se no congelamento do produto a uma temperatura abaixo de -200°C que, em seguida, é submetido à baixa pressão, fazendo com que a água congelada do material sublime, resultando num produto final livre de umidade e passível de ser reconstituído pela adição de água. O objetivo deste projeto foi obter RNA de bovinos e testar a liofilização como método para conservação de RNA. Foram realizadas extrações de RNA total de abomaso e linfonodo abomasal de 10 bezerros da raça Nelore utilizando-se o reagente Trizol®, segundo instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade foram avaliadas por espectrofotometria e em gel de agarose 2%. Para a liofilização utilizou-se o aparelho E-C Micro Modulyo. As amostras liofilizadas foram deixadas à temperatura ambiente. Para análise da qualidade do RNA liofilizado foi observada a intensidade luminosa das bandas de RNA 18S e 28S em gel de agarose 2 % corado com brometo de etídio (5 $\mu\text{g/ml}$). A corrida eletroforética foi de aproximadamente 60 minutos a 80 V. A visualização das bandas foi feita utilizando um transluminador (UVP) e a fotodocumentação com câmera KODAK Easy Share V530. As extrações de RNA apresentaram boa qualidade, não sendo observada no gel degradação. As razões RNA:proteínas obtidas foram 1,9 a 2,0 indicando alto grau de pureza de RNA. As quantidades de RNA variaram de 11,2 a 200 μg , suficiente para aplicação em diversos estudos. As amostras liofilizadas e depois reidratadas em água livre de RNase permaneceram íntegras, apresentando aspecto semelhante ao das amostras não liofilizadas, indicando que este pode ser um método utilizado na conservação de amostras de RNA.