

Análise de métodos para a conservação de RNA

Souza, JRT¹; Ibelli, AMG²; Regitano, LCA³

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

²Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos São Carlos, SP;

³Pesquisadora do Centro de Pesquisa Pecuária do Sudeste, EMBRAPA, São Carlos, SP
jutorini@gmail.com

Palavras-chave: RNA, métodos de conservação, criolofilização

Amostras de RNA com elevado grau de pureza e integridade são necessárias em diversos métodos de análise da expressão gênica. Em virtude da possibilidade de degradação enzimática, métodos eficazes de extração e armazenamento dessas amostras são necessários. Existem hoje no mercado reagentes que permitem a extração e a purificação de RNA de diversas amostras, com rapidez e eficiência, pois contêm simultaneamente desnaturantes, como o isotiocianato de guanidina, que impedem a ação enzimática, e solventes orgânicos que isolam o RNA do DNA e das proteínas. O objetivo deste projeto foi comparar a qualidade e integridade de RNA extraídos a partir de tecidos armazenados em RNAlater[®] e de tecidos criolofilizados, e testar diferentes métodos de armazenamento para conservação de RNA. Foram feitas quatro repetições, utilizando 1g de tecido intestinal de bovino de quatro animais diferentes. 500 mg de tecido foram divididos em duas partes iguais, uma foi mergulhada em 3mL de RNAlater[®] e mantida em freezer -20° C, e a outra, criolofilizada e mantida em temperatura ambiente livre de umidade. O RNA foi extraído dos 500 mg restantes, sendo dividido em cinco alíquotas iguais que foram estocadas usando cinco diferentes condições de armazenamento: criolofilização; solução formazol[®] à -20°C, solução formazol[®] à 4°C, água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) em freezer -80°C e etanol 75% em freezer -80°C. Após 10 dias, o RNA dos tecidos armazenados em RNAlater[®] e criolofilizados foi extraído. Os RNAs estocados foram ressuspensos em 50µL de água DEPC. A quantidade foi avaliada por espectrofotometria e a qualidade dos RNAs foi observada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio (5 µg/ml). As amostras de RNA mostraram-se íntegras antes de serem submetidas à armazenamento, não sendo observada degradação no gel de agarose. As razões RNA:proteínas variaram de 1,79 a 1,98 indicando alto grau de pureza de RNA. No armazenamento do tecido em RNAlater[®] a leitura 260nm teve média de 0,409 com desvio padrão de 0,159 e a concentração, média de 1636ng/µL, com desvio padrão de 636,96. No armazenamento do tecido criolofilizado, a leitura 260 teve média de 0,518 com desvio padrão de 0,1254 e a concentração média de 2073ng/µL com desvio padrão de 421,7. A comparação visual dos cinco diferentes métodos de armazenamento de RNA, observando-se a intensidade luminosa das bandas 18S e 28S em gel de agarose 1%, permitiu concluir que apenas as amostras armazenadas a -80°C em solução aquosa sofreram degradação no período avaliado. As amostras liofilizadas e depois reidratadas em água livre de RNase permaneceram íntegras, apresentando aspecto semelhante ao das amostras não liofilizadas, indicando que, além da utilização de agentes desnaturantes com o formazol[®] e o RNAlater[®], este pode ser um método utilizado na conservação de amostras de RNA.

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, EMBRAPA.