

Extração de RNA de cana-de-açúcar para estudos de expressão gênica

Gabriela Guerra^{1*}; Vanessa Galli²; Sérgio Delmar dos Anjos e Silva¹; Rafael da Silva Messias¹

¹Embrapa Clima Temperado²Universidade Federal de Pelotas. * gabiguerra0305@hotmail.com

A extração de RNA total é uma etapa fundamental para a avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real (qRT-PCR), onde é recomendável a utilização de RNA de alta qualidade, íntegro e livre de contaminação por RNases, proteínas, DNA genômico, enzimas e substâncias inibitórias das reações de RT-PCR. O objetivo deste trabalho foi comparar quatro métodos de extração de RNA em tecidos macerados de cana-de-açúcar. Para tanto, foram avaliados dois extratores comerciais, TRIzol® Reagent e Concert™ Plant RNA Reagent (de acordo com as especificações dos fabricantes), e dois extratores preparados em laboratório, CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio) e TENS (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS) em cinco diferentes genótipos e três diferentes partes amostradas da planta de cana-de-açúcar, folhas velhas, folhas novas e colmo, sendo estas primeiramente maceradas em gral com nitrogênio líquido. De forma a evitar possíveis degradações do RNA, durante a coleta das amostras fez-se uso inibidor de RNases (RNase Away®), sendo estas imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até o momento das extrações. Os RNAs isolados foram dissolvidos em 30µl de água ultra pura tratada com DEPC e suplementada com 1% EDTA. A qualidade dos RNAs totais foi avaliada em corrida eletroforética utilizando gel de agarose 1% e através de leitura em espectrofotômetro usando as relações A260/A280 que indica, para valores 1,8 e 2,0 ausência de contaminação por proteínas e fenóis e a relação A260/230 indicativa da ausência de polissacarídeos e outros; contaminantes orgânicos nas amostras isoladas para o intervalo. A concentração final dos RNAs extraídos foi posteriormente calculada após leitura em fluorômetro da marca Quibit. Observou-se uma melhor relação de qualidade do RNA total extraído com a utilização do método TENS, tendo ainda concentrações adequadas para realização das análises posteriores, além de caracterizar-se pela praticidade e baixo custo, sendo o colmo, a parte amostrada que apresentou melhor relação de qualidade e concentração. Os demais métodos testados ficaram na seguinte ordem de eficiência na extração: TRIzol® Reagent, Concert™ Plant RNA Reagent e CTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio), de acordo com os resultados obtidos.

Palavras-chaves: Extração, RNA, Cana-de-açúcar.