

27 e 28 de junho de 2012 - Ribeirão Preto SP

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO EFICIENTE PARA EXTRAÇÃO DE RNA A PARTIR DE FOLHAS JOVENS DE *Elaeis guineensis* Jacq.

Luiz Henrique Galli Vargas^I, André Pereira Leão^{II}, Marcelo Picanço de Farias^{III}, Alexandre Alonso Alves^{IV}, Eduardo Fernandes Formighieri^{IV}, Guy de Capdeville^{IV}, Manoel Teixeira Souza Júnior^{IV}

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo estabelecer um protocolo eficiente de extração de RNA a partir de folhas jovens de *Elaeis guineensis*, visando facilitar a rotina do laboratório, principalmente no que diz respeito a estudos posteriores envolvendo RNASeq, construção de biblioteca de cDNA e caracterização de Micro e Small RNAs da espécie em estudo pelo grupo de pesquisa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas seis variações de um protocolo de extração de RNA fornecido pelo produto comercial Concert™ Plant RNA Reagent, (Invitrogen) objetivando o melhor aproveitamento quantitativo e qualitativo de RNA a partir de material extraído de folhas jovens do acesso Tenera, de *Elaeis guineensis* (dendezeiro). O material foi coletado na Estação Experimental do Rio Urubú, localizado a aproximadamente 140 km de Manaus (Guillaumet *et al.*, 2003). Com a utilização do protocolo considerado original (Concert™), não se obtiveram resultados satisfatórios, fazendo com que se buscassem variações de protocolo que o tornasse mais eficiente para folhas jovens de *E. guineensis*.

Portanto, foram utilizadas seis variações do protocolo original, todas descritas na tabela 1. Cada ensaio consistiu de duas repetições por tratamento.

Tabela 1. Variações de protocolo de extração de RNA utilizadas para otimização do processo em *E. guineensis*.

Tratamento	Descrição
P ₀	Protocolo original;
P ₁	Clorofórmio: inverter 15 vezes; -20 °C por 30'; Isopropanol: vortex 5";
P ₂	Clorofórmio: vortex; 10' ambiente; Isopropanol:vortex 5";
P ₃	Clorofórmio:inverter 15 vezes; -20 °C por 30'; Isopropanol:inverter 15 vezes;
P ₄	Clorofórmio:vortex 1"; 10' ambiente; Isopropanol:inverter 15 vezes;
P ₅	Clorofórmio:inverter 15 vezes; 10' ambiente; Isopropanol:inverter 15 vezes;
P ₆	Clorofórmio:vortex 1"; -20 °C por 30'; Isopropanol:inverter 15 vezes.

A amostra P₀ (seguindo-se o protocolo original) foi extraída da seguinte maneira: Pulverizou-se 100 mg de tecido vegetal em almofariz contendo nitrogênio líquido. Transferiu-se o material para tubo de polipropileno de 1,5 ml até atingir a marca de 0,5 ml. Em cada tubo adicionou-se 500 µl de RNA purification solution (Concert™) à 4 °C. Na sequência, os tubos foram vertidos suavemente por 5" para homogeneização, permanecendo por mais 5' na horizontal. Centrifugou-se à 13200

^I Engº Agrônomo, Bolsista CNPq DTI nível 3 Embrapa Agroenergia, zealotrs@gmail.com; ^{II} MSc., Analista A, Embrapa Agroenergia; ^{III} Mestrando, Universidade Federal de Lavras; ^{IV} DSc, Pesquisador A, Embrapa Agroenergia.

rpm, à 4 °C, por 5'. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo de polipropileno já contendo 100 µl de NaCl (cloreto de sódio) 5M e 300 µl de clorofórmio (gelado), vortexando-se por 1", seguido de inversão suave por 5' para homogeneização da solução. Posteriormente os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 13200 rpm, à 4 °C durante 10', após finalizada essa etapa a fase superior foi transferida para outro tubo de polipropileno de 1,5 ml, adicionando-se 500 µl de isopropanol gelado e vortexando por 5". Os tubos foram então deixados sob temperatura ambiente por 30'. Passado o tempo de espera, as amostras foram submetidas a centrifugação à 13200 rpm sob temperatura de 4 °C por 10' sendo que, após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado mantendo-se os *pellets* formados nos tubos. Adicionou-se 1 µl de etanol 75% (gelado) para lavagem dos *pellets*, descartando-se em seguida o sobrenadante e deixando as amostras secarem completamente por 15' a uma temperatura de 37 °C (banho seco). Finalmente, os *pellets* foram ressuspensos em 50 µl de água ultra pura, e armazenados à - 20 °C. Procederam-se as seis variações deste protocolo, como descrito acima, e os resultados obtidos após quantificação em espectrofotômetro (*NanoDrop® ND-1000*) encontram-se na tabela 2.

Tabela 2. Resultados obtidos após análise quantitativa e qualitativa das seis variações do protocolo de extração de RNA para *E. guineensis*.

Tratamento	Ng/µl	260/280 nm	260/230 nm
P ₀	15,04	0,80	0,69
P ₀	12,35	0,71	0,57
P ₁	47,40	1,84	0,70
P ₁	50,69	1,88	0,69
P ₂	62,89	1,93	1,02
P ₂	115,36	1,98	0,25
P ₃	272,07	1,89	1,51
P ₃	82,91	2,27	1,23
P ₄	44,56	1,97	0,86
P ₄	83,42	1,94	0,61
P ₅	43,66	1,88	1,76
P ₅	34,01	1,99	1,52
P ₆	50,32	1,80	0,70
P ₆	94,96	1,83	0,58

Valores considerados ideais: 260/280 nm: ≥ 1,8; 260/230 nm: ≥ 1,8.

Após análise dos resultados, concluiu-se que os protocolos que apresentaram os melhores resultados para extração de RNA em *E. guineensis* foram P₃ e P₅ os quais foram testados novamente para comparação entre si. Novamente foram preparadas amostras com duas repetições cada, sendo inseridas ainda mais duas variações que consistiram nas seguintes mudanças:

- Clorofórmio com álcool isoamílico em substituição do clorofórmio puro no tratamento P₃, sendo denominado P₃₋₂;
- Clorofórmio com álcool isoamílico em substituição do clorofórmio puro no tratamento P₅, sendo denominado P₅₋₂.

Realizaram-se os procedimentos de extração e quantificação de RNA, apresentando os seguintes resultados, detalhados na tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos após análise quantitativa e qualitativa de quatro variações do protocolo de extração de RNA para *E. guineensis*.

Tratamento	Ng/ μ l	260/280 nm	260/230 nm
P ₃	43,69	2,01	1,82
P ₃	19,22	1,88	1,68
P ₃₋₂	44,63	1,95	1,93
P ₃₋₂	41,07	1,98	2,23
P ₅	48,79	1,84	1,66
P ₅	62,37	1,79	1,51
P ₅₋₂	159,56	1,82	1,72
P ₅₋₂	86,37	1,88	1,76

Valores considerados ideais: 260/280 nm: $\geq 1,8$; 260/230 nm: $\geq 1,8$.

As amostras foram identificadas e armazenadas à -20 °C para estudos posteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em um primeiro momento, os melhores resultados obtidos, em relação ao protocolo original (P₀), foram as variações de protocolo de extração de RNA denominadas P₃ e P₅. Estes resultados, porém não são considerados ideais (260/280 nm = < 1,8 e 260/230 nm < 1,8), necessitando assim que os protocolos fossem repetidos e ainda adicionadas mais duas variações (P₃₋₂ e P₅₋₂). Depois de avaliadas as seis variações de protocolo iniciais (P₁ até P₆) além das duas variações adicionais (P₃₋₂ e P₅₋₂), chegou-se a conclusão que o protocolo aqui denominado P₃₋₂ é considerado um protocolo eficiente na extração de RNA a partir de folhas jovens de dendezeiro apresentando valores de 260/280 nm $\geq 1,8$ e 260/230 nm $\geq 1,8$. Embora a variação P₃ tenha mostrado um valor próximo do considerado ideal, manteve-se ainda abaixo dos valores indicativos de qualidade buscados neste estudo.

CONCLUSÃO

Este experimento possibilitou a identificação de um protocolo eficiente para extração de RNA de folhas jovens de dendezeiro, baseado no protocolo Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen). Obteve-se variação considerada ótima utilizando-se o protocolo aqui denominado P₃₋₂. Assim nos estudos subsequentes com *E. guineensis* desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (tais como biblioteca cDNA e RNASeq) será rotineira a obtenção de RNA de qualidade a partir de folhas jovens desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Guillaumet, J. ; Rodrigues, M. R. L. ; Miranda, I.P.A . A Estação Experimental do Dendê do Rio Urubu - EERU - Embrapa Amazônia Ocidental. **Ecosistemas florestais em áreas manejadas na amazônia**. 1 ed. Manaus: INPA/PPG-7, 2003, v. 1, p. 30-65.

Invitrogen. Concert™ Cytoplasmic RNA Reagent: **Catalog no. 12322-012. 2001**. Disponível em: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cytorna_man.pdf>. Acesso em: 15 Abril 2012.