

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE HOMOGENEIZAÇÃO CELULAR E CONGELAMENTO PARA EXTRAÇÃO DE RNA

**Bruna Petry^{1*}; Ricardo Zanella²; Adriana Mércia Guaratini Ibelli³;
Jorge Augusto Petrolí Marchesi⁴; José Rodrigo Claudio Pandolfi⁵;
Mônica Corrêa Ledur⁵ e Jane de Oliveira Peixoto⁵**

¹Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus de Joaçaba, Bolsista PIBIC/CNPq - Embrapa Suínos e Aves, e-mail: bruuna_petry@gmail.com

²Bolsista BJT/CNPq - Embrapa Suínos e Aves

³Analista da Embrapa Suínos e Aves

⁴Universidade do Contestado

⁵Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: RNA, extração de ácidos nucleicos, expressão gênica.

INTRODUÇÃO

A extração de DNA e RNA é uma das principais e mais importante etapas para a realização da maioria das metodologias utilizadas na biologia molecular. As amostras podem ser obtidas dos mais diversos tecidos e células e para que a extração possa ser feita, há uma infinidade de protocolos e reagentes que podem ser utilizados nesses procedimentos (2). Através de análises de RNA várias informações importantes sobre a expressão gênica e caracterização de transcritos podem ser obtidas, desde que o RNA seja extraído e purificado eficientemente, mantendo sua integridade e qualidade (1). Por isso, uma das maiores preocupações durante a extração do RNA é a sua degradação pela ação de ribonucleases (RNAses), que são enzimas altamente resistentes a diversos tratamentos, inclusive térmicos. Após a coleta, uma das etapas chave na extração de RNA é a maceração e lise dos tecidos ou células e as condições em que estes são submetidos (4). Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi comparar dois métodos de ruptura de tecidos, sob condições de resfriamento e congelamento, em amostras provenientes de ossos de aves.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de ossos de galinha da população TT da Embrapa Suínos e Aves foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Após, estas amostras foram mantidas em freezer -80°C até o início dos testes. Aproximadamente 100 mg de tecido foram submetidos à quatro procedimentos de extração de RNA com Trizol (Invitrogen) (2). Nos protocolos 1 e 2, as amostras congeladas foram retiradas para extração e mantidas em nitrogênio líquido até a adição de Trizol. Nos protocolos 3 e 4 as amostras foram descongeladas e mantidas em gelo por aproximadamente 10 minutos até a adição do Trizol. Antes de iniciar a extração, as amostras dos protocolos 1 e 3 foram maceradas em almofariz de porcelana contendo nitrogênio líquido, enquanto que as dos protocolos 2 e 4 foram colocadas em Eppendorf 1,5mL contendo 1 mL de Trizol, esferas de aço inoxidável de 3.2 mm e colocadas no disputor de tecidos *Bullet Blender*, durante 5 minutos a velocidade 5. Após, a extração foi realizada com o protocolo padrão do Trizol (Invitrogen). A verificação da quantidade e pureza do RNA foi feita em espectrofotômetro Nanodrop e a qualidade foi verificada em gel de agarose 1% e em equipamento Bioanalyzer. A fim de verificar a influência do tipo de protocolo utilizado em estudos de PCR quantitativo, o cDNA das amostras dos 4 protocolos foi sintetizado a partir de 3 µg de RNA e então foram feitas reações de PCR em tempo real no equipamento 7500 SDS (*Applied Biosystems*) para os genes constitutivos *HPRT1*, *RPLP1*, *GAPDH*, *HBMS* e *RPL30*. O Ct (*threshold cycle*) foi obtido e as variações entre os protocolos foram avaliadas. Foram considerados os melhores protocolos aqueles que obtiveram os menores Cts.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado no gel de agarose 1% (Fig.1A), as amostras dos protocolos que permaneceram congeladas em nitrogênio líquido até a adição do Trizol (1 e 2) e do protocolo 3 que foi mantida em gelo e macerada em cadinho apresentaram as bandas de RNA ribossomal 28 e 18S nítidas, indicando que o RNA estava íntegro após as extrações. Já para o protocolo 4 mantido em gelo e homogeneizado em *bullet blender*, foi observada degradação parcial do RNA. Resultados semelhantes foram obtidos pela análise realizada em equipamento Bioanalyzer (Fig.1B), que utiliza eletroforese microfluídica e um algoritmo para verificação da qualidade do RNA (RIN). Nesta última análise, as amostras 1 e 3 apresentaram RIN maior que 8.0, indicando alta qualidade e integridade do RNA (Tabela 1). Em estudo semelhante, Carter *et al.* (2012) também observaram que ao usar amostras em temperatura próxima ao congelamento, o rendimento da extração do RNA era maior (3). Quando se

observou os resultados da qPCR, (Tabela 1) foi possível concluir que as amplificações das amostras do protocolos 1 e 3, seguido pelo protocolo 2 foram melhores, ou seja, apresentaram os Cts menores, diferentemente do que ocorreu com as amostras do protocolo 4, que teve amplificação tardia para todos os genes avaliados. Isso indica que o descongelamento, associado à homogeneização de tecidos em solução, pode prejudicar a qualidade do RNA e, conseqüentemente, as análises de RT-PCR em tempo real.

CONCLUSÕES

Amostras que serão utilizadas para extração de RNA devem ser mantidas congeladas (em -80°C ou nitrogênio líquido) por todo período antes da sua utilização, incluindo o período de ruptura dos tecidos. O descongelamento, associado à homogeneização dos tecidos em solução deve ser evitado, pois compromete a qualidade do RNA e conseqüentemente as análises de expressão gênica.

REFERÊNCIAS

1. IBELLI, A.M.G.; REGITANO, L. C. A.; MÉO, S. C. Extração de RNA in **Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas a Produção Animal**. São Carlos, SP. Embrapa Pecuária Sudeste, 2009. p.11-13.
2. IBELLI, A. M. G.; REGITANO, L. C. de A.; NICIMURA, S. C. M. Extração de RNA. In: REGITANO, L. C. de A.; NICIURA, S. C. M.; IBELLI, A. M. G.; GOUVEIA, J. J. de S. **Protocolos em biologia molecular aplicada à produção animal**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. p. 9-13.
3. CARTER, L. E.; KILROY, G.; GIMBLE, J. M.; FLOYD, E. **An improved method for isolation of RNA from bone. BMC Biotechnology**. 12:5, 2012.
4. Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes. BG581 – GENÉTICA MOLECULAR 2011. Instituto de Biologia. UNICAMP, SP.

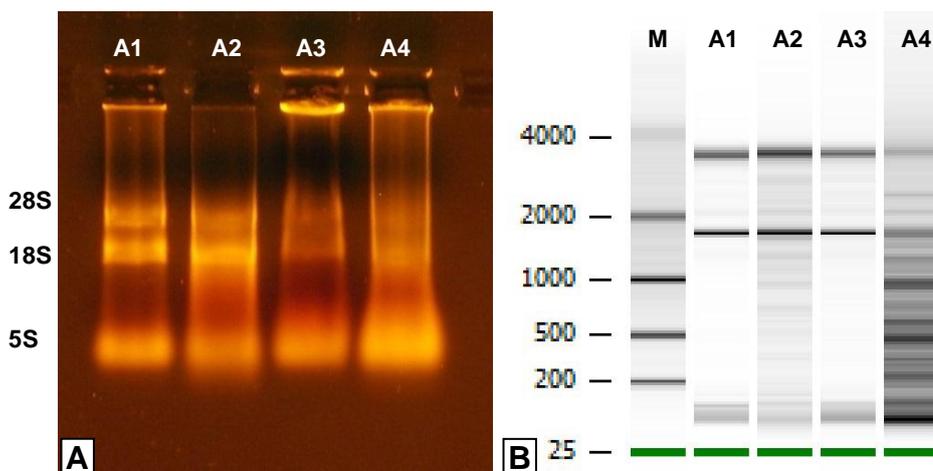


Figura 1. (A) Resultado das amostras em Gel de Agarose 1% e em equipamento Bioanalyzer (B)

Tabela 1. Resultados da quantidade (concentração em ng/μL) e qualidade (razão 260/280) de RNA medida em Nanodrop e no Bioanalyzer (integridade – RIN) e valores de Ct obtidos para cada um dos genes nas reações de qPCR

Amostras	Concentração (ng/μL)	Razão (260/280)	RIN	Valor de Ct				
				HPRT1	RPLP1	GAPDH	HBMS	RPL30
Protocolo 1	1069.3	1.84	9.2	20.18	16.32	19.32	20.07	16.82
Protocolo 2	717.0	1.82	7.2	22.10	17.83	19.30	23.05	19.92
Protocolo 3	1280.0	1.95	9.0	20.65	16.33	16.60	22.03	17.11
Protocolo 4	2822.4	1.81	3.2	25.56	20.58	21.63	27.92	21.92