

Extração Conjunta de DNA e RNA Bacteriano de alta Pureza

André Luiz Martinez de Oliveira¹
Jean Luiz Simões-Araújo²
José Ivo Baldani²

Introdução

Entre os microrganismos, as bactérias representam a classe mais abundante e desempenham importantes funções em diversos ciclos biogeoquímicos relevantes à continuação da existência dos seres vivos, como por exemplo os ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre, degradação de diversos compostos orgânicos, entre outros. O domínio do conhecimento sobre a dinâmica biológica de tais ciclos depende da compreensão das relações entre diversidade genética e diversidade funcional. As técnicas tradicionais de microbiologia, baseadas em isolamento e cultivo em meios artificiais, bem como nas técnicas dependentes da biologia molecular, baseadas em análises da estrutura e expressão da informação genética contida nos ácidos nucleicos (DNA e RNA), vêm fornecendo importantes contribuições para a compreensão da dinâmica da microbiota em diversos habitats. As técnicas biomoleculares para o estudo de microrganismos requerem o isolamento rápido das moléculas de DNA e RNA, as quais devem estar intactas e competentes para serem utilizadas nos protocolos de hibridização, reações de amplificação, clonagem e sequenciamento, etc. Estas ferramentas têm se mostrado importantes para o entendimento da dinâmica funcional da microbiota do solo (BULL et al., 2000).

Metodologias de extração de DNA e RNA bacteriano tem sido descritas continuamente, sempre na busca da melhoria de parâmetros

como qualidade do extrato, rapidez, baixo custo e eliminação do uso de reagentes tóxicos e radiativos. O grupo do Laboratório de Genética e Bioquímica da Embrapa Agrobiologia vêm utilizando algumas destas técnicas como rotina nos estudos da diversidade de microrganismos fixadores do nitrogênio atmosférico, entre outros.

Metodologia

A partir de protocolos de rotina, e de referências metodológicas sobre a extração de moléculas de RNA (AUSUBEL et al., 1999; SAMBROOK et al., 1987; RIVAS et al., 2001; NUYTS et al., 2001), foi otimizado um protocolo para a extração conjunta de moléculas de DNA e RNA a partir de células bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas, cultivadas em meio de cultivo líquido.

Para validar a metodologia, foi realizada a extração de ácidos nucleicos totais em algumas espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, em dois estádios metabólicos de crescimento (fase logarítmica e fase estacionária). Os ácidos nucleicos obtidos foram quantificados e a qualidade dos extratos foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose, espectrofotometria e reações de RT-PCR (transcrição reversa-PCR) utilizando primers universais direcionados para a identificação de genes de expressão constitutiva e não constitutiva.

Para tanto, as estirpes HCC103 de *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, PPe8 de *Burkholderia tropica* e

¹ Pós-Doutorando em Genética pela UFRJ. Departamento de Bioquímica Médica. E-mail: almoliva@yahoo.com.br

² Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, BR 465, km 07, Caixa Postal 74.505. CEP 23851-970, Seropédica, RJ

Y2 de *Azospirillum brasilense* foram cultivadas em meio líquido de Dygs (DÖBEREINER et al., 1995), e as estirpes DH10B de *Escherichia coli* (todas Gram-negativas) e S76 de *Bacillus thuringiensis* (Gram-positiva) em meio LB líquido (DÖBEREINER et al., 1995). Para a extração de ácidos nucleicos foram utilizados microtubos plásticos novos (volume 1,5 mL), assumidos como isentos de contaminação por RNA, DNA, nucleases e ribonucleases. As soluções utilizadas foram tratadas ou preparadas com água tratada com DEPC (0,1% DEPC por 24 horas, seguidos de esterilização em autoclave por 20 minutos a 120°C). Após as coletas o material foi mantido em gelo quando em repouso, bem como os reagentes, soluções e a água foram previamente resfriados, exceto quando discriminado o contrário. Todas as centrifugações foram realizadas a 4°C. Foram coletados 2,0 mL de células em tubos plásticos e centrifugadas por 5 minutos a 4.200 g. O sobrenadante foi descartado e as células imediatamente imersas em nitrogênio líquido. Seguiu-se a ressuspensão em 570 µL de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8,0) e 30 µL de solução de SDS 10%. Após agitação vigorosa por 10 segundos, o material foi mantido por uma hora em agitação a 200 rpm em temperatura ambiente. A seguir, foram adicionados 100 µL de NaCl (5 M), nova agitação vigorosa por 10 segundos, seguido da adição de 100 µL de solução de CTAB (CTAB 10% em NaCl 0,7 M). Seguiu-se nova agitação a 200 rpm por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 800 µL de solução clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), e agitação por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos, e feita a coleta do sobrenadante para novo microtubo plástico, com a adição de 1 volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). A homogeneização foi feita por inversão por 10 minutos à temperatura ambiente e nova centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. A fase aquosa resultante foi transferida para novo tubo plástico, onde foram adicionados 0,1 volumes de acetato de sódio (3 M, pH 5,0) e 2 volumes de etanol absoluto. A precipitação foi feita incubando os tubos a -20°C por no mínimo 3 horas, seguida por centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi lavado com 1 mL de etanol (70%),

por duas vezes e sem agitação, centrifugando-se a 7.000 g por 5 minutos cada vez. Após descarte do sobrenadante da última lavagem, o precipitado foi deixado sobre gelo para a evaporação do etanol por aproximadamente 30 minutos. A solubilização dos ácidos nucleicos foi feita pela adição de 50 µL de água, com os tubos deixados em repouso por 15 a 20 minutos.

A qualidade dos extratos foi verificada pela visualização após eletroforese em gel de agarose a 1%, com corrente de 100 volts por 15 minutos em tampão TAE (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA, pH 8,0) e corado com brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) por 10 minutos. A análise dos extratos em espectrofotômetro foi feita com dois comprimentos de onda (260 nm e 280 nm). A leitura de absorvância a 260 nm permitiu a quantificação dos extratos, e a relação 260_{D.O.}/280_{D.O.} forneceu uma avaliação da pureza dos extratos. Para as reações de PCR, o material foi tratado com 25 µg de RNase por 30 minutos a 37°C. Para as reações de RT-PCR, o material foi tratado conforme WANG et al. (2002), utilizando-se 10 U de DNase I - RNase free, 0,45 mM de MnSO₄ por 15 minutos em temperatura ambiente (~25°C). Após o tratamento com ribonucleases, a inativação enzimática foi feita com um volume de clorofórmio, centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. A seguir foi feita a coleta da fase aquosa em novo microtubo plástico, e o material foi precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio (3 M, pH 5,0) e dois volumes de etanol absoluto, incubação a -20°C por 20 minutos e centrifugação a 10.000 g por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi feita a lavagem do precipitado com 1 mL de etanol 70%. A secagem do precipitado foi feita sobre gelo e o RNA livre de DNA foi ressuspendido em água. A eficiência dos tratamentos com DNase foi confirmada por visualização em gel de agarose a 1% em tampão TAE conforme anteriormente descrito.

Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que foi possível isolar conjuntamente DNA e RNA de alta qualidade, de todas as espécies bacterianas avaliadas nos estádios Log e estacionário das culturas (Figuras 1 e 2). As avaliações em gel de agarose e por espectrofotometria demonstraram

alto rendimento e pureza nas extrações (Tabela 1). As reações de transcriptase reversa atestaram a qualidade do RNA para futuras análises com outras as ferramentas de biologia molecular (Figura 3). A metodologia acima descrita é de baixo custo se comparada ao custo dos “kits” comerciais usados na extração de moléculas de RNA. Além disso, a mesma pode ser aplicada no isolamento de ácidos nucleicos de espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O isolamento conjunto das moléculas de DNA e RNA apresentou pureza e rendimento para aplicação de diversas ferramentas moleculares, além de apresentar rapidez no processamento das amostras o que permite a extração de um grande número de amostras por vez.

Tabela 1 – Pureza e rendimento dos extratos de ácidos nucleicos totais de bactérias.

Amostras		D.O.	D. O.	Pureza	Rendimen-
Estirpe*	Estádio metabólico	260 nm	280 nm	(260 nm/ 280 nm)	to (µg/µL)
HCC 103	(G-) Fase logarítmica	0,867	0,428	2,03	1,734
HCC 103	(G-) Fase estacionária	1,637	0,760	2,15	3,274
PPe8	(G-) Fase logarítmica	1,133	0,514	2,20	2,266
PPe8	(G-) Fase estacionária	1,293	0,599	2,16	2,586
Y2	(G-) Fase logarítmica	0,350	0,160	2,19	0,700
Y2	(G-) Fase estacionária	0,438	0,203	2,16	0,876
PAL 5	(G-) Fase logarítmica	0,272	0,160	1,70	0,544
DH10B	(G-) Fase logarítmica	1,260	0,562	2,24	2,520
DH10B	(G-) Fase estacionária	2,275	1,004	2,27	4,550
S 76	(G+) Fase logarítmica	1,446	0,968	1,49	2,892
S 76	(G+) Fase estacionária	2,083	0,686	3,04	4,166

* G-, Gram negativa; G+, Gram positiva

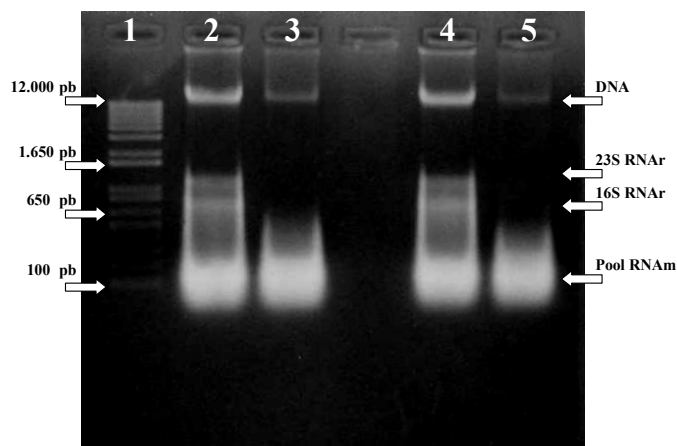


Figura 1 – Ácidos nucleicos totais extraídos das estirpes HCC 103 de *H. rubrisubalbicans* e Y2 de *A. brasilense* coletados em dois estádios de crescimento. Linha 1: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Gibco BRL); Linhas 2 e 3: estirpe HCC 103 coletada na fase de crescimento exponencial; Linhas 4 e 5: estirpe Y2 coletada na fase de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente.

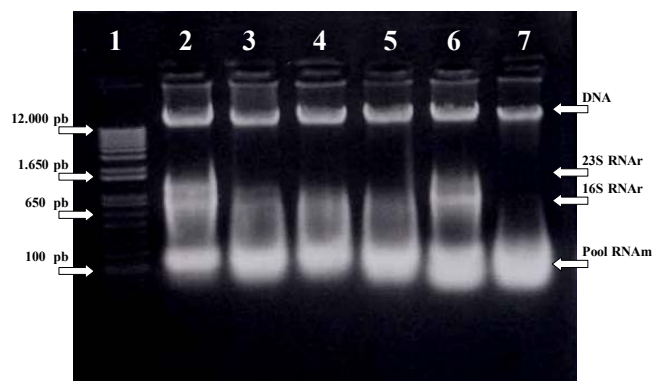


Figura 2 – Ácidos nucleicos totais extraídos das estirpes PPe8 de *B. tropica*, DH10B de *E. coli* e S 76 de *B. thuringiensis*, em dois estádios de crescimento. Linha 1: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Gibco BRL); Linhas 2 e 3: estirpe PPe8 coletada na fase de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente; Linhas 4 e 5: estirpe DH10B coletada na fase de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente; Linhas 6 e 7: Estirpe S 76 coletada na fase de crescimento exponencial e estacionária, respectivamente.

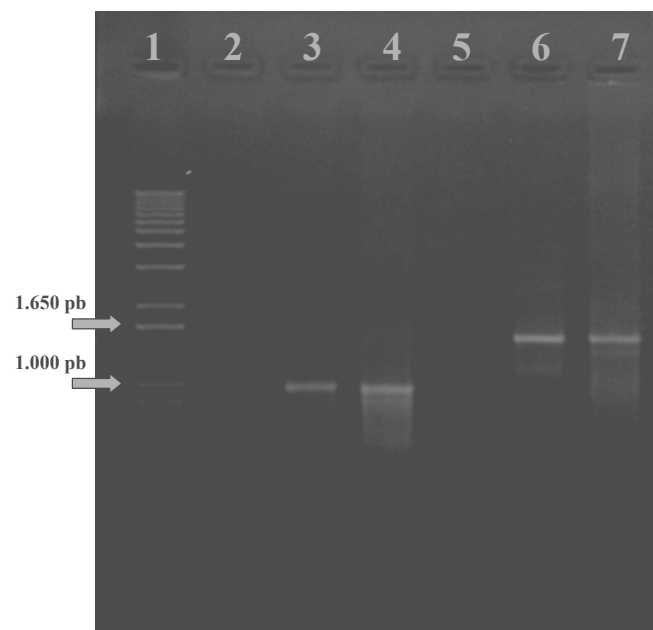


Figura 3 – Produtos de amplificação de RT-PCR utilizando RNA extraído da estirpe HCC103 de *H. rubrisubalbicans* coletada na fase de crescimento exponencial. Linha 1: marcador de massa molecular 1 kb ladder (Gibco BRL); Linha 2: reação de PCR com as amostras na ausência da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Invitrogen) e iniciadores específicos para a região gênica da proteína NifH; Linha 3: produto de amplificação utilizando iniciadores específicos para RNAm da região gênica codificadora da proteína NifH (enzima Superscript II, Invitrogen); Linha 4: produto de amplificação utilizando iniciadores específicos para RNAm da região gênica codificadora da proteína NifH (enzima MasterAmp, Epicentre); Linha 5: reação de PCR com as amostras na ausência da enzima transcriptase reversa (enzima MasterAmp, Epicentre) e iniciadores universais para a subunidade 16S RNAr; Linha 6: produto de amplificação utilizando iniciadores universais para a subunidade 16S RNAr (enzima Superscript II, Invitrogen); Linha 7: produto de amplificação utilizando iniciadores universais para a subunidade 16S RNAr (enzima MasterAmp, Epicentre).

Referências Bibliográficas

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short protocols in molecular biology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1999. p. 2.11-2.12.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 576-606, 2000.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI; Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.

NUYTS, S.; MELLAERT, L. V.; LAMBIM, P.; ANNÉ, J. Efficient isolation of total RNA from *Clostridium* without DNA contamination. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 4, p. 235-238, 2001.

RIVAS, R.; VIZCAÍNO, N.; BUEY, R. M.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; VELÁZQUEZ, E. An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 47, p. 59-63, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning – A Laboratory Manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1987. p. E.3-E.4.

WANG, G.; BARTON, C.; RODGERS, F. G. Bacterial DNA decontamination for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Journal of Bacteriological Methods**, Amsterdam, v. 51, p. 119-121, 2002.

Comunicado Técnico, 75

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7
Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil
Telefone: (0xx21) 2682-1500
Fax: (0xx21) 2682-1230
Home page: www.cnpab.embrapa.br
e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

1ª impressão (2005): 50 exemplares



Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento
Governo Federal

Comitê de publicações

Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente

Revisor e/ou ad hoc: Kátia Regina dos Santos Teixeira e Gustavo Ribeiro Xavier
Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix.
Edição eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia.