

# Ajustes no protocolo de DNA CTAB 2x para extração de DNA em diversas espécies vegetais

## Adjustment in the protocol of DNA CTAB 2x for DNA extraction of many plant species

---

Roberta Samara Nunes de Lima<sup>1</sup>; Carlos Antonio F. Santos<sup>2</sup>; Marciene Amorim Rodrigues<sup>3</sup>; Patrícia Pires Batista<sup>4</sup>

### Resumo

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA. O objetivo do presente trabalho foi ajustar a técnica de extração de DNA a partir de diferentes concentrações de β-mercaptoetanol, utilizando o protocolo CTAB 2X. DNA genômico total foi isolado de folhas verdes e sadias em espécies distintas como umbuzeiro, mangueira, cebola e goiabeira, segundo protocolo do CTAB 2X com algumas adaptações (500 mM Tris pH 8,0; 1,4 M NaCl; CTAB 0,2% (p/v); 2% β-mercaptoetanol; 20 mM de EDTA). A concentração do β-mercaptoetanol utilizado foi de 2%, um aumento de 10X em relação ao protocolo padrão. A concentração e a integridade do DNA genômico foram observadas em géis 0.8% de agarose comum, comparado a um DNA lambda de 30, 50 e 100 ng/mL. As amostras extraídas com a concentração de 2% de β-mercaptoetanol tiveram melhores resultados, comparando-se com a concentração de 0,2% estabelecida no protocolo CTAB. Este procedimento

---

<sup>1</sup>Bióloga, Bolsista do CNPq/Embrapa Semi-Árido, Cx. Postal 23, 56302-970, Petrolina-PE; <sup>2</sup>Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph.D, Pesquisador da Embrapa Semi-Árido, casantos@cpatsa.embrapa.br; <sup>3</sup>Estudante de Ciências Biológicas, Bolsista do CNPq/Embrapa Semi-Árido; <sup>4</sup>Ciências Biomédicas. M.Sc.

resultou em extração satisfatória para a maioria dos métodos de amplificação de DNA via PCR, nas distintas espécies estudadas.

Palavras-chaves: extração, DNA, espécies vegetais.

## Introdução

Diversas técnicas de biologia molecular estão disponíveis para a detecção da variabilidade genética ao nível de seqüência de DNA como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e microsatélites visando a detecção de polimorfismo genético. Essas técnicas permitem a obtenção de um número muito grande de marcadores moleculares, cobrindo todo o genoma do organismo. Tais marcadores podem ser utilizadas para as mais diversas aplicações, tanto no estudo de genética como no melhoramento de plantas e animais (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A identificação e a caracterização da diversidade genética de plantas por meio de marcadores moleculares envolvem a avaliação de vários indivíduos, necessitando-se, portanto, de métodos rápidos e precisos de extração do DNA.

O objetivo de qualquer protocolo de extração é a obtenção de DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente. Os protocolos de extração devem evitar a degradação do DNA pelas DNAses, eliminar os polissacarídeos, que inibem a ação de enzimas, e as substâncias fenólicas ou outros compostos secundários, que podem danificar o DNA. Geralmente, o que se observa é o uso de protocolos com algumas modificações visando resolver problemas metodológicos na espécie em estudo (Ferreira & Grattapaglia, 1995). De modo geral, o protocolo de extração de DNA mais utilizado para as diferentes espécies é o CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) padrão com algumas modificações.

Este trabalho teve como objetivo ajustar um protocolo geral de extração de DNA CTAB 2x para as espécies de mangueira (*Mangifera indica* L.), goiabeira (*Psidium guajava* L.), cebola (*Allium cepa* L.) e umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr.), avaliando sua eficiência em géis de agarose e comparando com DNA de concentração conhecida.

## Material e Métodos

Foram coletadas, no total, 269 folhas saudáveis de espécies diferentes (umbuzeiro, goiaba, cebola e manga). DNA genômico total foi isolado de folhas verdes e saudáveis, segundo protocolo de Doyle & Doyle (1990), com algumas adaptações (500 mM Tris pH 8,0; 1,4 M NaCl; CTAB 0,2% (p/v); 2%  $\beta$ -mercaptoetanol; 20 mM de EDTA). Foi utilizada a concentração do  $\beta$ -mercaptoetanol de 2%, um aumento de 10x em relação ao protocolo padrão.

Aproximadamente 150 mg de tecido foliar foi pulverizado em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido, para romper as paredes e membranas celulares. Posteriormente, o tecido pulverizado foi coletado com uma espátula de plástico descartável, evitando-se contaminação na tampa do microtubo, para suspensão em 950  $\mu$ L tampão de extração CTAB 2X em microtubos. Todas as amostras maceradas foram mantidas a temperatura ambiente até a obtenção de um lote de 24. A suspensão foi incubada a 60°C, durante 30 minutos, em banho-maria e homogeneizada a cada 10 minutos. Após retirar os tubos do banho-maria, eles foram esfriados por 5 minutos e as amostras foram desproteinizadas com CIA (Clorofórmio Álcool Isoamílico) (24:1), centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm. A fase aquosa superior foi transferida para um novo microtubo, adicionando-se 2/3 do volume alíquotado (~480  $\mu$ L) de álcool isopropílico (-20°C) para a precipitação dos ácidos nucleicos, mantendo-se os tubos no gelo por aproximadamente 30 min. Logo após, centrifugou-se por 10 min a 11000 rpm, descartando-se o sobrenadante em recipiente apropriado em capela de exaustão. Esperou-se a evaporação do álcool por 2 h e o DNA foi diluído em 20 mL de TE (10mM Tris-HCl, pH 8,0; 1mM EDTA), armazenando-se em geladeira. No dia seguinte, adicionou-se 10% do volume da solução de DNA de RNase (10 mg/mL) em cada microtubo e colocou-se em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. As amostras foram armazenadas a -20°C. Todo o material de extração de DNA (almofariz, pistilo e espátula de plástico descartável) foi tratado com ácido clorídrico 3 N.

A concentração e integridade do DNA genômico foram observadas em géis 0.8% de agarose comum, comparando-se a DNA lambda de 30, 50 e 100 ng/mL. Para cada amostra, foram alíquotadas 5  $\mu$ L do DNA estoque e 3  $\mu$ L do tampão de carregamento (azul de bromofenol e glicerol), submetendo-se em seguida a uma corrida em eletroforese a 100 V, por 1 hora. O DNA genômico foi visualizado em transiluminador de luz UV e fotodocumentado por meio do Sistema Digital Olympus.

## Resultados e Discussão

As amostras extraídas com a concentração de 2% de  $\beta$ -mercaptoetanol tiveram melhores resultados, comparando-se com a concentração de 0,2% estabelecida no protocolo CTAB, (aumento de 10x) (Fig. 1), pois apresentaram concentrações variando de 50 a 250 ng/ $\mu$ L, enquanto na concentração de 0,2% a concentração variou de 5 a 30 ng/ $\mu$ L (Fig. 1).

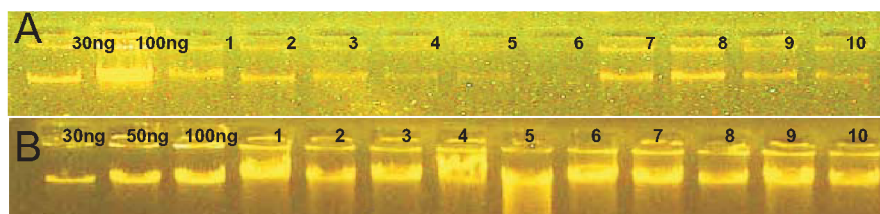


Fig. 1. Géis de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, com padrões de 30, 50 e 100 ng e volume de  $\beta$ -mercaptoetanol etanol 0,2% (A) e 2% (B).

A adoção da espátula de plástico descartável foi importante para evitar a presença de tecido foliar macerado nas bordas do microtubo e contaminações na retirada da fase aquosa após a precipitação com CIA e centrifugação. O estrito controle no tempo no banho-maria, 30 min, também resultou num maior sucesso de extração de DNA para um maior número de indivíduos. Das 269 amostras extraídas todas apresentaram concentração de DNA entre 30 e 250 ng/ $\mu$ L. O custo de extração por amostra pelo método CTAB foi estimado em R\$ 1,00, enquanto o custo de extração/ amostra de um kit comercial foi estimado em R\$ 8,00.

Este procedimento resultou em extração satisfatória para a maioria dos métodos de amplificação de DNA via PCR, em espécies distintas como: a) mangueira - foram extraídas 117 amostras, média geral de 192,0 ng/ $\mu$ L, amplitude de 50 a 250 ng/ $\mu$ L; b) umbuzeiro - foram extraídas 89 amostras, média geral de 116,0 ng/ $\mu$ L, amplitude de 30 a 200 ng/ $\mu$ L; c) cebola - foram extraídas 41 amostras, média geral de 108,50 ng/ $\mu$ L, amplitude de 100 a 150 ng/ $\mu$ L; d) goiabeira - foram extraídas 22 amostras, média geral de 99,9 ng/ $\mu$ L, amplitude de 50 a 200 ng/ $\mu$ L.

## Referências Bibliográficas

DOYLE, J. J. T.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília, DF: EMBRAPA CENARGEN, 1995. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).