

## ANÁLISE DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA DE PÊLOS DE BOVINOS

Glicia Maria de Almeida<sup>1,2</sup>, Fábio Mendonça Diniz<sup>3</sup>, Raimundo Martins Filho<sup>4</sup>, Geraldo Magela Cortes Carvalho<sup>3</sup>, Fábio Barros Britto<sup>3</sup>, Paulo Sarmanho de Costa Lima<sup>3</sup>, Adriana Mello Araújo<sup>3</sup>, Teresa Cristina A. de Lima<sup>5</sup>, Marineide R. do Amorim<sup>5</sup>, Geice Ribeiro da Silva<sup>5</sup>

O método tradicional de extração de DNA de mamíferos utiliza sangue periférico dos animais. Este protocolo permite obtenção de DNA de alta qualidade e que por esta razão é bastante utilizado em trabalhos que propõem conservação de material *ex situ*. Apesar disto, a extração de DNA de sangue periférico requer tempo e os custos são altos. Uma vez que a coleta dos mesmos não oferece risco à sanidade do animal. Neste trabalho foi verificado a viabilidade de três protocolos para extração de DNA a partir de bulbos pilosos de bovinos. Foram coletados os pêlos da vassoura (porção final da cauda) de três raças. As amostras foram levadas ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte onde utilizou-se os seguintes protocolos: (1) Chelex 10%, (2) Chelex 10% + proteinase K e (3) CTAB. Os protocolos 1 e 3 encontram-se descritos na literatura. No protocolo 2 acrescentou-se proteinase K à solução de extração contendo os bulbos e estes foram deixados a 55°C, *overnight*, antes de prosseguir com o protocolo original. Os critérios considerados para análise dos protocolos foram, o tempo para extração, segurança (utilização de substâncias tóxicas) e quantidade do DNA extraído. Os resultados mostraram que o protocolo 2 rendeu maior quantidade de DNA com alto peso molecular, no entanto o procedimento requereu maior tempo, já que as amostras foram deixadas *overnight* para otimizar a digestão das proteínas. O protocolo 1 rendeu menor quantidade de DNA, porém foi o mais rápido. Regiões nucleares do DNA extraído foram amplificadas através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), sendo que as amostras submetidas a este protocolo apresentaram excelente padrão de bandeamento. Juntos, os protocolos 1 e 2 se mostraram os mais seguros. O protocolo 3, apesar de eficiente, requer maior atenção por fazer uso de substâncias de natureza mutagênica. Como vantagem, este protocolo exige menor tempo de execução quando comparado ao protocolo 2. Os resultados indicaram que as três técnicas são viáveis para extração de DNA genômico a partir de bulbos pilosos de bovinos. Porém, os protocolos que utilizam a resina de Chelex mostram-se mais eficientes para estudos genéticos devido ao mínimo tempo exigido para extração e obtenção de DNA não-fragmentado de alto peso molecular.

**Palavras-chave:** Chelex, Proteinase-K, CTAB, DNA.

<sup>1</sup> Aluna de Mestrado em Ciência Animal UFPI, <sup>2</sup> Bolsista de Pós-Graduação da CAPES, <sup>3</sup> Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, <sup>4</sup> Professor UFPI, <sup>5</sup> Estagiário do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte.

## INTRODUÇÃO

O isolamento do DNA é uma etapa importante na análise de estrutura e organização do genoma dos animais. Independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese (ROMANO; MIRANDA, 1999). Estas exigências são necessária uma vez, que a extração de DNA compreende uma etapa importante do processo de identificação do genótipo dos indivíduos (LACORTE et al., 2004).

Lacorte et al. (2004) nos afirma que o método tradicional de extração de DNA de mamíferos utilizando sangue periférico garante DNA de alta qualidade. Por esta razão, este protocolo de extração de DNA tem sido o mais utilizado em trabalhos que propõem a conservação de material *ex situ*, no qual o DNA é conservado por vários anos em Bancos de Germoplasma.

A extração de DNA de sangue periférico requer tempo e os custos são altos. Para estudos como os de diversidade genética populacional e grau de parentesco a obtenção de DNA de forma mais rápida e menos dispendiosa torna-se uma estratégia mais interessante. Uma alternativa para a obtenção de material para a extração de DNA minimizando as condições descritas para o protocolo de extração a partir de sangue, seria a utilização de bulbos pilosos, principalmente porque esta opção não oferece risco à sanidade do animal.

Vários tecidos podem ser utilizados para extração de DNA, como exemplo, o sangue de aves (CAMPOS et al., 2003), o folículos pilosos de caprinos (MENDONÇA; ARAÚJO, 2003), mucosa bucal de eqüinos (LACORTE et al., 2004), tecido muscular em suínos (SOLLERO et al., 2004), o sêmen e pêlos de touros de raças zebuínas (COELHO et al., 2004). Apesar de utilizarem protocolos diferentes todos os autores tiveram o mesmo objetivo, obter DNA de alta qualidade.

Os protocolos para extração de DNA diferem de acordo com o objetivo do trabalho. Por isso, encontram-se na literatura vários protocolos de extração de DNA que atendem a diversas necessidades dos estudos em genética como, a qualidade na preservação do material, o tempo de extração minimizado e a obtenção dos genótipos de interesse.

Assim, estudos básicos sobre metodologias específicas que possam otimizar a extração de DNA de boa qualidade de uma amostra de tecido animal, para que as regiões desejadas sejam localizadas e amplificadas, são de grande importância para o desenvolvimento de pesquisas no campo da biologia molecular (MARENGONI, 2006).

## OBJETIVO

Neste trabalho propõe-se avaliar a eficiência dos protocolos CTAB, Chelex, Chelex com proteinase K para extração de DNA a partir de bulbos pilosos de bovinos como uma alternativa para o estudo de diversidade genética em que o DNA seja obtido com menor tempo, menores custos e com qualidade.

## MATERIAL E METODOS

### Coleta das Amostras

Foram coletados os pêlos da vassoura (porção final da cauda) de três raças de bovinos pertencentes a Embrapa Meio-Norte. As amostras proveniente da raça Pé-duro, Gir e Holandês foram levadas ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte onde selecionou-se dez bulbos pilosos para realizar a extração de DNA.

### Protocolos de extração

#### 1 - Chelex 10%

A base deste protocolo é solução com 10g de Chelex e 100ml de água estéril. Deixou-se a solução em luz UV por 10 min e depois adicionou-se 500 $\mu$ l da solução sobre os dez bulbos pilosos, cortados a 0,5cm do pêlo. Incubou-se os bulbos com solução de Chelex 10% em banho-maria a 95°C por 20 min. Após este tempo, centrifugou-se por 3 min a 14.000 rpm e retirou-se o sobrenadante, contendo o DNA que foi estocado a - 20°C .

#### 2 - Chelex 10% + proteinase K.

O protocolo foi modificado a partir do protocolo chelex 10%. Sobre os bulbos pilosos selecionados adicionou 250 $\mu$ l de solução Chelex 10% e 20 $\mu$ l de proteinase K. Esta solução permaneceu em banho-maria por 55°C *overnight*. Depois o material foi centrifugado por 3 min a 14 000rpm e o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf e armazenado a - 20°C.

3) CTAB. Acrescentou-se 500 $\mu$ l de solução CTAB aos bulbos pilosos selecionados e em seguida o material foi encubado a 65° por 1h. Centrifugou a solução por 15 min a 14000rpm e retirou o sobrenadante. Adicionou-se 500 $\mu$ l de clorofórmio álcool – isoamílico e centrifugou-se com as mesmas condições já citada. Depois de retirar o sobrenadante foi acrescentado 250 $\mu$ l de isopropanol deixando-o na geladeira por 30 min. Centrifugou-se novamente a solução descartando o sobrenadante e lavando o pellet com 1ml de etanol a 75% a cada duas centrifugações de 2 min a 14000rpm. Descartou-se o sobrenadante e deixou o pellet secar por 25 min. Finalizando com a adição de 50 $\mu$ l de TE e o armazenamento a 4°C.

### Gel de Agarose 1%

Para visualizar o DNA extraído preparou-se um gel com 4g de agarose e 80ml de EDTA. Pipetou-se um volume de 10 $\mu$ l de amostra e 4 $\mu$ l de corante em cada canaleta e a corrida da amostra foi realizada em 60 volts.

### PCR – primers universais

Para confirmar a integridade do DNA obtido realizou-se uma PCR (Reação em cadeia da Polimerase) que permitiu observar a qualidade do DNA extraído nos três protocolos. A PCR apresentou volume total de 20 $\mu$ l, sendo constituída de 11 $\mu$ l de água estéril, 2,5 $\mu$ l Buffer 1,25X [20mM Tris HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA; 1mM DTT; 50% (v/v) glicerol], MgCl<sub>2</sub> 1,75mM, dNTP 800 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ Mol de cada primer, 1U de Taq DNA polimerase e 2 $\mu$ L da amostra de DNA (100ng). Os loci *Sar* e *Sbr* foram utilizados para amplificar fragmento do genoma bovino nas seguintes condições temperatura inicial 94°C por 4min, 30 ciclos com perfil 94°C por 1min, 50°C por 1min, 72°C por 1min e 72° por 7min.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os critérios considerados para análise dos protocolos foram os tempos para extração, segurança (utilização de substâncias tóxicas) e quantidade do DNA extraído. Com os resultados observamos que o protocolo 2 rendeu maior quantidade de DNA com alto peso molecular e o protocolo 1 rendeu menor quantidade de DNA, que foi verificado através da PCR (figura 1 e 2).

Avaliação da quantidade de DNA encontrada neste trabalho difere dos resultados obtidos por COELHO et al. (2004) que avaliou a concentração de DNA extraído através de três protocolos e de três diferentes tecidos, não encontrando diferença significativa na quantidade de DNA. No entanto, o mesmo autor observou diferença significativa para a extração de DNA provenientes do mesmo tecido, mas utilizando diferentes protocolos. A compreensão para estas diferenças não seriam a condição fisiológica das células epiteliais que constituem o bulbo piloso, mas provavelmente a ação da proteínase K que promove a degradação dos constituintes protéicos da célula deixando o DNA mais acessível aos reagentes.

O protocolo 2 requereu maior tempo, já que as amostras foram deixadas *overnight* para otimizar a ação da proteínase K, no entanto, o protocolo 1 permitiu a realização de uma extração rápida, com menores custos e maior segurança. Porém, este protocolo por fornecer uma quantidade mínima de DNA (Figura 1) não é indicado com método para trabalhos que necessitam armazenar o material genético.

Concordamos com LACORTE et al., (2004) ao afirmar que a extração de DNA a partir de pêlos é uma técnica que oferece praticidade de coleta, não requerendo refrigeração e podendo ser empregado para obter DNA de animais que seria inviável através de outras técnicas. Porém, deve-se atentar para as interferências que a resina Chelex pode ocasionar no desenvolvimento do trabalho, inibindo ação da enzima na PCR.

As regiões nucleares do DNA extraído foram amplificadas através da Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), sendo que as amostras submetidas a este protocolo apresentaram excelente padrão de bandamento (Figura 2).

O protocolo 3, apesar de eficiente, requer maior atenção por fazer uso de substâncias de natureza mutagênica. Como vantagem, este protocolo exige menor tempo de execução quando comparado ao protocolo 2.

Neste trabalho foi verificado, assim como LACORTE et al. (2004) também observou, que as técnicas que usa o Chelex são viáveis para extração de DNA genômico a partir de bulbos pilosos, apesar de apresentar baixo rendimento quando comparado ao protocolo de extração de DNA do sangue.

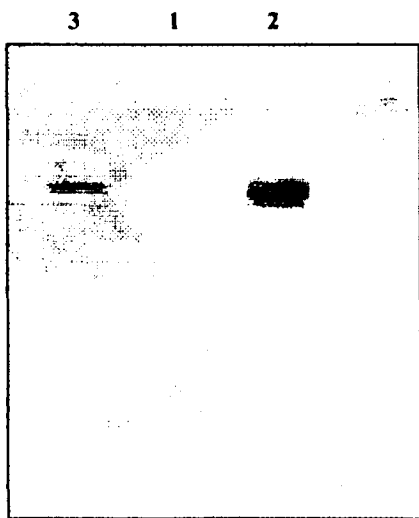


FIGURA 1: Extração de DNA dos três protocolos 1- chelex, 2 chelex + proteinase K e 3 CTAB

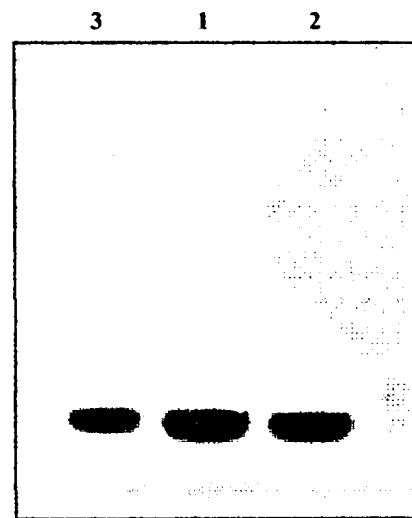


FIGURA 2: PCR das extrações utilizando primers universais. 1- chelex, 2 chelex + proteinase K e 3 CTAB

### CONCLUSÃO

Os protocolos que utilizam a resina de Chelex mostram-se eficientes para estudos genéticos, pois permitem a obtenção de DNA não-fragmentado de alto peso molecular e com segurança. Porém o protocolo 2 é o que apresenta maior concentração de DNA.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

LACORTE, G.A; DIAS, I.M.G.; CARVALHO, M.R.S. Extração não-invasiva de DNA de *Equus caballus*: uma avaliação de métodos, in: V Simpósio de SBMA. Pirassununga-SP, 2004

SOLLERO, B. P.; FARIA, D. A.; PAIVA, S. R.; GUIMARÃES, S. E. F.; LOPES, P. S.; PAIXÃO, D. M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 13., 2004. Brasília. Anais... Brasília: SBZ, 2004. CD-ROM.

ROMANO, E.; MIRANDA, A. C. B. Extração de DNA de plantas: soluções para problemas comumente encontrados. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v.2, n.9, p.40-43, 1999.

COELHO, E. G. A.; OLIVEIRA, D. A. A.; TEIXEIRA, C. S.; SAMPAIO, I. B. M.; RODRIGUES, S. G.; ALVES, C. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.56, n.1, p.111-115, 2004.

CAMPOS, R. L. R.; AMBO, M.; NONES, K.; RUY, D. C.; BARON, E.; DEDUR, M. C.; COUTINHO, L. L. Otimização e comparação de protocolos para extração de DNA de sangue de aves. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 49., 2003. Águas de Lindóia. Anais...Águas de Lindóia: SBG, 2003. p.282.

MENDONÇA, P. T.; ARAÚJO, M. A. Técnica de extração de DNA de folículos pilosos em caprinos. In: SIMPÓSIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13., 2003, Viçosa. Anais...Viçosa: UFV, 2003. CD-ROM.

PAIVA, S. R. Influência de obstáculos naturais na divergência de populações de *Astyanax bimaculatus* na bacia do rio Doce-MG. 2001. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

POVH, J. A.; BLANCK, D. V.; PETRONILO, V.; MOREIRA, H. L. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L., CAVALIERI, R. F.D.; BENITES, C. Comparação de duas linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 5., CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 12., 2003, Uberaba. Anais... Uberaba: ABCZ – ABZ, 2003. p.417-421.

MARENGONI, N. G.; MACHADO, M. R. F.; GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. *Medicina veterinária*. Londrina v.27, n.1, 2006 p 99-106