

Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para Extração de DNA de Tecido Vegetal em Larga Escala



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento***

Documentos 104

Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para Extração de DNA de Tecido Vegetal em Larga Escala

Ubiraci Gomes de Paula Lana
Priscila Cordeiro Gomes
Carlos Fasane da Silva Tinoco
Belkiss Cristina França Silva Oliveira
Claudia Teixeira Guimarães
Jurandir Vieira de Magalhães

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2010

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: www.cnpms.embrapa.br

E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, João Herbert Moreira Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Supervisão editorial: Adriana Noce

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Carlos Fasane da Silva Tinoco

1ª edição

1ª impressão (2010): on line

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Milho e Sorgo**

Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para extração de DNA de tecido vegetal em larga escala / Ubiraci Gomes de Paula Lana [et al.]. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2010.
19 p. : il. -- (Documentos / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1518-4277; 104).

1. Biologia molecular. 2. Milho. 3. Sorgo. 4. Equipamento. I. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. II. Série.

CDD 574.88 (21. ed.)

© Embrapa 2010

Autores

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Químico, Doutorando em Genética, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

ubiraci@cnpms.embrapa.br

Priscila Cordeiro Gomes

Farmacêutica, MSc em Ciência de Alimentos, Analista da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

Carlos Fasane da Silva Tinoco

Graduando em Ciências Biológicas, Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM.

carlosfasane@yahoo.com.br

Belkiss Cristina França Silva Oliveira

Licenciada em Ciências Biológicas, Centro Universitário de Sete Lagoas – UNIFEMM.

belkiss71@yahoo.com.br

Claudia Teixeira Guimarães

Engenheira Agrônoma, Doutora em Genética Molecular, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

claudia@cnpms.embrapa.br

Jurandir Vieira de Magalhães

Engenheiro Agrônomo, Doutor em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG.

jurandir@cnpms.embrapa.br

Sumário

Introdução	7
Objetivo	7
Preparo das Amostras	8
Materiais e Equipamentos	8
Procedimento	8
Extração do DNA	10
Materiais e Equipamentos	10
Reagentes, Soluções e Tampões	10
Procedimento	10
Preparo de Tampões	16
Tampão CTAB	16
Tampão TE pH 8,0	16
Medidas de Segurança	17
Equipamentos de Proteção (EPI e EPC)	17
Descarte	17

Procedimento da Embrapa Milho e Sorgo para Extração de DNA de Tecido Vegetal em Larga Escala

Ubiraci Gomes de Paula Lana

Priscila Cordeiro Gomes

Carlos Fasane da Silva Tinoco

Belkiss Cristina França Silva Oliveira

Claudia Teixeira Guimarães

Jurandir Vieira de Magalhães

Introdução

A extração de DNA vegetal de um grande número de amostras pode ser demorada e gerar um volume considerável de resíduos químicos. Esta metodologia apresenta uma estratégia de isolamento de DNA de plantas em larga escala com concentração e qualidade suficientes para diversas análises genético-moleculares. Entre suas vantagens destacam-se a necessidade de uma quantidade reduzida de tecido vegetal e a rapidez do processo, além da redução do volume de resíduos em comparação com os procedimentos tradicionais.

Objetivo

Este documento apresenta a metodologia para a extração de DNA de folhas de milho e sorgo em grande escala, utilizando o triturador Geno/Grinder 2000 (Figura 1).

Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco



Figura 1. Imagem do triturador Geno/Grinder 2000.

Preparo das Amostras

Materiais e Equipamentos

- Alicate de coleta
- Caixa de isopor
- Freezer -80°C
- Gelo
- Liofilizador
- Placa e tubos

Procedimento

- Coletar 04 discos de tecido fresco de folhas jovens por amostra com auxílio de um alicate (Figura 2).

Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco



Figura 2. Alicate utilizado na coleta de tecido vegetal para extração de DNA.

- Colocar as amostras nos tubos específicos distribuídos em placas de capacidade para 96 amostras (Figura 3). As placas deverão permanecer dentro de uma caixa de isopor com gelo.
- Tampar a placa (Figura 4).

Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

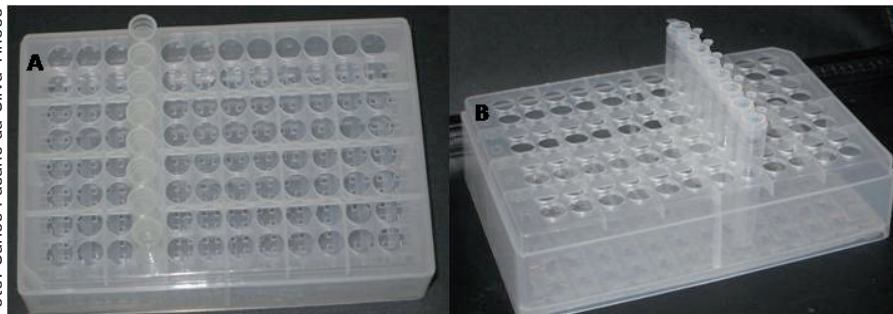


Figura 3. Tubos específicos para o triturador sem tampa (A) e com tampa (B).



Figura 4. Placa tampada.

- Fazer um mapa com identificação/localização das amostras e identificar a placa.
- Armazenar a -80°C até o início do processo de liofilização.
- Liofilizar as amostras por 48 horas.
- Caso as amostras não sejam utilizadas imediatamente, armazenar novamente a -80°C até o momento da maceração e da extração.

Extração do DNA

Materiais e Equipamentos

- Banho-maria
- Centrífuga de placas
- Capela de exaustão
- Esferas de aço
- Estufa
- Freezer -20°C
- Pipeta multicanal eletrônica
- Porta-esferas
- Triturador (Geno/Grinder 2000)

Reagentes, Soluções e Tampões

- Tampão CTAB 2% (Mistura de brometos de alquiltrimetilamônio)
- β -Mercaptoetanol p.a.
- Clorofórmio-octanol 24:1 (v/v)
- Isopropanol p.a. gelado a -20°C
- Etanol 70% (v/v) gelado a -20°C
- Tampão TE pH 8,0 (Tris-EDTA)
- RNase A (10 mg/mL)

Procedimento

- Preparar previamente o tampão CTAB contendo β -mercaptoetanol a 2% (m/v). Fazer os cálculos previamente de acordo com a quantidade de amostras, considerando um volume individual de tampão de 400 μ L. O β -mercaptoetanol deverá ser adicionado na hora do uso.
- Retirar as tampas e colocar esferas de aço em cada tubo contendo as amostras liofilizadas em gelo com auxílio de um porta-esferas (Figura 5) e tampar os tubos (Figura 6).
- Tampar as placas.

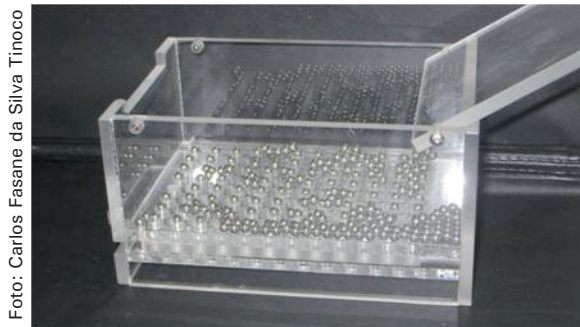


Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

Figura 5. Imagem do porta-esferas.

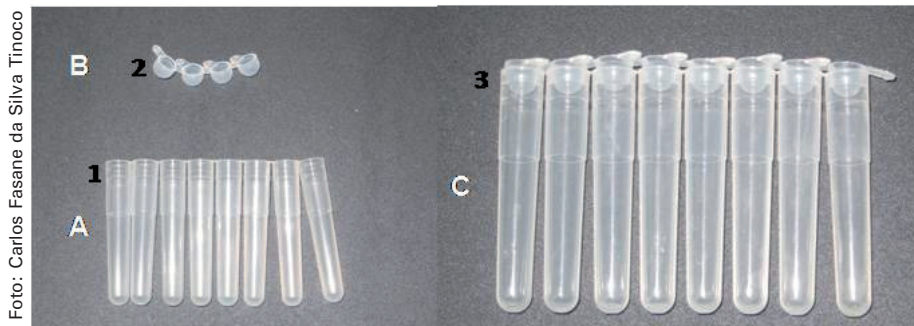


Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

Figura 6. Detalhe dos tubos para o triturador (A), as tampas (B) e os tubos tampados (C).

- Introduzir as placas no equipamento de maceração, fixando-as no suporte (Figura 7).



Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

Figura 7. Placas balanceadas fixadas no suporte do triturador.

- Selecionar 1750 batidas/min (*strokes/min*) por 6 min (Figuras 8 e 9).
 A cada 2 min parar a trituração e verificar as características do tecido macerado, que deverá se tornar um pó fino e verde. Quando estas características foram atingidas pode-se interromper a trituração. Caso a maceração não tenha sido suficiente repetir este procedimento.

Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

RATE (Dial Setting)	STROKES / MINUTE	
	0.5 X RATE	1 x RATE
Left - 000	500	1000
100	550	1100
200	600	1200
300	650	1300
400	700	1400
500	750	1500
600	800	1600
700	850	1700
800	900	1800
900	950	1900
Right - 000	1000	2000

Figura 8. Tabela com os parâmetros para maceração.



Figura 9. Imagem do *display* do Geno/Grinder.

- Retirar as tampas e tomar cuidado com as trocas de posição, pois pode haver contaminação de uma amostra para outra.
- Na capela de exaustão, adicionar 400 μL de tampão de CTAB 2% (m/v), previamente preparado. Pipetar com pipeta multicanal eletrônica duas vezes de 200 μL .
- Tampar os tubos e placas. Introduzir as placas novamente no equipamento de maceração, fixando-as no suporte
- Selecionar 1750 batidas/min (*strokes/min*) por 10 seg.

- Centrifugar por 15 segundos a 4000 rpm em centrífuga de placas. Em todas as centrifugações o equipamento deverá estar balanceado (Figura 10).

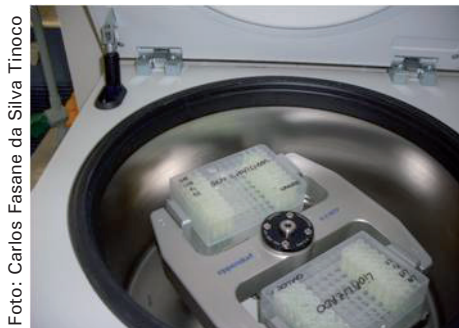


Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

Figura 10. Centrífuga de placas balanceada.

- Incubar as amostras em banho-maria a 65°C por uma hora. Com o objetivo de facilitar o contato térmico, remover o fundo da placa e adaptá-lo sobre as tampas dos tubos, prendendo com um elástico. A água do banho-maria deve ficar acima do volume de amostras contido nos tubos (Figura 11).



Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

Figura 11. Amostras incubadas em banho-maria.

- Homogeneizar a cada 10 min, agitando levemente. **Atenção: evitar a agitação por inversão.**

- Retirar a placa do banho-maria e resfriar na capela de exaustão por 5 minutos.
- Centrifugar, por 15 segundos a 4000 rpm em centrífuga de placas.
- Retirar as tampas das amostras na capela de exaustão. Cuidado para não haver troca de tampas entre as amostras. Atenção: nesta etapa pode haver projeção de líquido.
- Adicionar 300 μL de clorofórmio-octanol 24:1 (v/v). Pipetar com pipeta multicanal eletrônica duas vezes de 150 μL .
- Tampar os tubos e as placas. Colocar um papel toalha entre os tubos tampados e a tampa da placa (Figura 12).

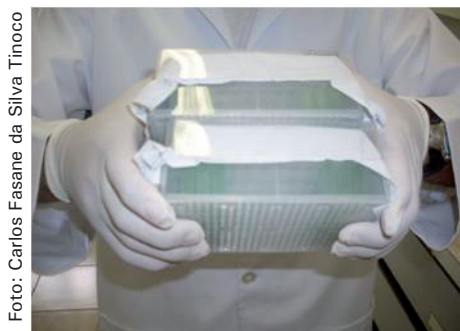


Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

Figura 12. Placas prontas para homogeneização por inversão.

- Homogeneizar cuidadosamente a placa por inversão cerca de 30 vezes.
- Centrifugar por 5 min a 2500 rpm.
- Na capela de exaustão, retirar as tampas e tomar o cuidado para não trocá-las entre as amostras.
- Retirar o sobrenadante com a pipeta multicanal eletrônica e transferir para outra placa contendo tubos e tampas novos. O volume retirado nesta etapa deverá ser em torno 200 μL , pois pode variar entre as amostras. Ao retirar o sobrenadante, tomar o cuidado para não contaminá-lo com o precipitado.
- Ao sobrenadante, adicionar 300 μL de isopropanol p.a. gelado a -20°C . Pipetar com pipeta multicanal eletrônica duas vezes de 150 μL (Figura 13).



Foto: Carlos Fasane da Silva Tinoco

Figura 13. Uso da pipeta multicanal eletrônica.

- Tampar os tubos e as placas. Colocar papel toalha entre os tubos tampados e a tampa das placas (Figura 12).
- Homogeneizar a placa por inversão cerca de 15 vezes.
- Incubar a -20°C por uma hora.
- Centrifugar por 15 min a 4000 rpm.
- Retirar as tampas e tomar o cuidado para não trocá-las entre as amostras.
- Cuidadosamente, descartar o sobrenadante por inversão, removendo individualmente cada tubo. Remover o excesso de líquido invertendo os tubos brevemente sobre papel toalha. **OBS.:** *Caso seja possível a visualização de precipitado, o descarte deverá ser realizado do lado contrário do precipitado. Caso o precipitado não esteja preso ao fundo do tubo, repetir a última etapa de centrifugação.*
- Ao precipitado, adicionar $300\ \mu\text{L}$ de etanol 70% (v/v) gelado a -20°C . Pipetar com pipeta multicanal eletrônica duas vezes de $150\ \mu\text{L}$.
- Tampar os tubos e as placas.
- Centrifugar a 4000 rpm por 5 min.
- Cuidadosamente, descartar o sobrenadante por inversão, removendo individualmente cada fileira (oito tubos). Remover o excesso de etanol invertendo os tubos brevemente sobre papel toalha.
- Secar na estufa a 65°C até a evaporação completa do etanol. Nesta etapa, o precipitado ficará mais visível. Este processo não deverá demorar mais que 5 min.

- Ressuspender cada amostra com 100 μ L de TE pH 8,0 contendo 0,2 μ L de RNase A (10 mg/mL). Se necessário, pode-se agitar brevemente em vortex.
- Tampar os tubos, as placas e armazenar a -20°C .
- Normalmente, a concentração final média de DNA é de 150 ng/ μ L.

Preparo de Tampões

Tampão CTAB 2% (m/v)

- Medir 470 mL de H_2O deionizada utilizando-se uma proveta de 500 mL.
- Medir 200 mL de Tris-HCl 1 mol/L pH7,5 utilizando-se uma proveta de 500 mL.
- Transferir para um béquer de 1000 mL.
- Adicionar 280 mL de solução de NaCl 5 mol/L medidos em proveta de 500 mL.
- Adicionar 40 mL de EDTA 0,5 mol/L pH 8,0 medidos em proveta de 100 mL.
- Adicionar, sob intensa agitação, 20 g de CTAB.
- Agitar até completa dissolução e armazenar a 4°C em frasco devidamente identificado até o momento do uso.

Tampão TE pH 8,0

- Medir 10 mL de Tris-HCl 1 mol/L pH 8,0 em pipeta graduada.
- Medir 2 mL de EDTA 0,5 mol/L pH 8,0 em pipeta graduada.
- Transferir para um balão volumétrico de 1000 mL contendo aproximadamente 600 mL de água ultrapura.
- Acertar o volume para 1000 mL.
- Armazenar a 4°C em frasco devidamente identificado até o momento do uso.

Medidas de Segurança

O β -mercaptoetanol é uma substância tóxica e de odor desagradável. Todas as etapas de manipulação deverão ser realizadas na capela de exaustão de gases. É obrigatório o uso de EPI (equipamento de proteção individual) e EPC (equipamento de proteção coletiva).

Equipamentos de Proteção (EPI e EPC)

Guarda-pó de manga longa, sapatos fechados, óculos de segurança, luvas de látex, capela de exaustão de gases.

Descarte

Todas as ponteiros e microtubos contaminados com β -mercaptoetanol e clorofórmio deverão ser descartados em lixo apropriado e identificado, localizado na capela de exaustão.

Embrapa

Milho e Sorgo

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

