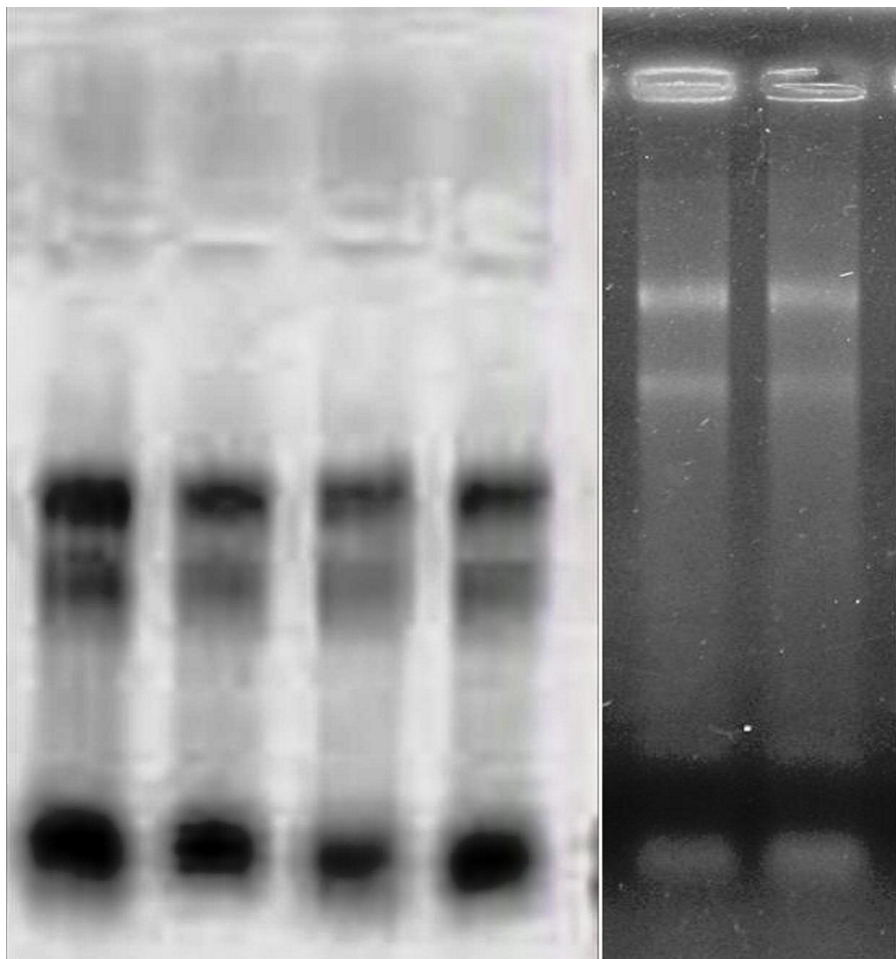


**Avaliação de diferentes métodos
para extração de RNA total
de folhas e raízes de braquiária**



ISSN 1983-9715

Dezembro, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 29

**Avaliação de diferentes
métodos para extração de
RNA total de folhas e raízes de
braquiária**

*Gislayne de Araujo Bitencourt
Lucimara Chiari
Cacilda Borges do Valle
Valdemir Antônio Laura
José Roberto Moro*

Embrapa Gado de Corte
Campo Grande, MS
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262, Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 3368 2083

Fax: (67) 3368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: publicacoes@cnpqc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Pedro Paulo Pires*

Secretário-Executivo: *Wilson Werner Koller*

Membros: *Rodrigo Carvalho Alva, Elane de Souza Salles, Valdemir Antônio Laura, Dalziza Montenário de Aguiar, Davi José Bungenstab, Jaqueline Rosemeire Verzignassi, Roberto Giolo de Almeida, Vanessa Felipe de Souza*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto e Editoração Eletrônica: *Rodrigo Carvalho Alva*

Normalização bibliográfica: *Elane de Souza Salles*

Foto da capa: *Lucimara Chiari*

1ª edição

Versão online (2011)

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 Gado de Corte.

Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária / Gislayne de Araújo Bitencourt ... [et al.]. — [Dados eletrônicos]. -- Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, 2011.

22 p. ; 21 cm. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Gado de Corte, ISSN1983-974X ; 29).

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/bp/BP29.pdf>>

Título da página da Web (acesso em 29 de dezembro de 2011).

Outros autores: Lucimara Chiari ; Cacilda Borges do Valle ; Valdemir Antônio Laura ; José Roberto Moro.

1. Pastagem. 2. Melhoramento genético vegetal. 3. Gramínea forrageira. 4. Brachiaria. 5. Urochloa. 6. Ácido ribonucleico. 7. RNA. I. Bitencourt, Gislayne de Araújo. II. Chiari, Lucimara. III. Valle, Cacilda Borges do. IV. Laura, Valdemir Antônio. V. Moro, José Roberto. VI. Série.

Sumário

Resumo	7
Abstract.....	9
Introdução.....	9
Material e Métodos.....	11
Preparo do material vegetal	11
Protocolos utilizados para a extração de RNA	11
Quantificação das amostras de RNA	15
Eletroforese do RNA isolado	16
Síntese do DNA complementar (cDNA)	16
Quantificação das amostras de cDNA	17
Resultados e discussão	18
Conclusões.....	21
Agradecimentos	21
Referências bibliográficas	21

Avaliação de diferentes métodos para extração de RNA total de folhas e raízes de braquiária

Gislayne de Araujo Bitencourt

Lucimara Chiari

Cacilda Borges do Valle

Valdemir Antônio Laura

José Roberto Moro

Resumo

A extração de RNA a partir de tecidos específicos consiste no primeiro passo para estudos de expressão gênica e caracterização de transcritos. Plantas, em geral, contêm grande quantidade de compostos fenólicos e/ou polissacarídeos em seus tecidos, o que pode comprometer a extração e purificação de moléculas de RNA. O objetivo principal deste trabalho foi testar diferentes protocolos para extrair RNA total de folhas e raízes de braquiária. Sementes de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk foram germinadas e plântulas com 12 dias foram utilizadas. As extrações de RNA foram feitas em duplicatas de 200 mg de amostras de folhas ou raízes pulverizadas com nitrogênio líquido. Para as extrações de RNA de folhas foram testados os reagentes Trizol[®] e Brazol[®] e para as extrações de RNA de raízes foram testados estes reagentes mais dois kits comerciais: SV Wizard Isolation

1Bióloga, Estudante de mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP Campus de Jaboticabal. Av. Prof. Paulo Donato Castellane s/n., 17884-900, Jaboticabal, SP. Endereço eletrônico: gislayne86@hotmail.com

2Bióloga, D.Sc., Pesquisadora na Embrapa Gado de Corte. BR 262 Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970, Campo Grande, MS. Endereço eletrônico: lchiari@cnpdc.embrapa.br

3Eng. Agrônoma, PhD., Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte. Endereço eletrônico: cacilda@cnpdc.embrapa.br

4Eng. Agrônomo, D.Sc., Pesquisador da Embrapa Gado de Corte. Endereço eletrônico: valdemir@cnpdc.embrapa.br

5Eng. Agrônomo, D.Sc., Professor Titular do Departamento de Biologia aplicada à Agropecuária na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP Campus de Jaboticabal. Endereço eletrônico: jrmoro@fcav.unesp.br

RNA system (Promega®) e Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex®). ANOVA e teste Tukey (1 % de significância) foram utilizados para comparar as médias das concentrações e de qualidade das amostras de RNA extraídas. Os resultados mostraram diferenças não-significativas entre as concentrações e a qualidade do RNA extraído de folhas pelos reagentes Trizol® e Brazol®. Entretanto, para as amostras de raízes as concentrações e qualidade do RNA isolado foram significativamente diferentes, sendo o reagente Trizol® mais eficiente. Os dois kits isolaram menores concentrações de RNA com qualidade inferior a obtida com os dois reagentes testados. Para síntese de DNA complementar (cDNA) foram testadas duas enzimas: SuperScript RTII (Invitrogen®) e M-MLV-RT (Sigma®), sendo esta última mais eficiente, pois foi possível obter maior quantidade e qualidade de cDNA, com relação a presença de contaminantes. Esses resultados podem ser considerados como ponto de partida para a execução de trabalhos sobre expressão gênica em espécies de *Brachiaria*.

Termos para indexação: ácido ribonucleico, *Brachiaria*, gramíneas forrageiras tropicais, expressão gênica, *Urochloa*.

Extraction of total RNA from leaves and roots of brachiariagrass

Abstract

RNA extraction from specific tissues is a preliminary step for studies of gene expression and characterization of transcripts. Plants, in general, have high quantity of phenolic compounds and/or polysaccharides in its tissues, compromising the extraction and purification of RNAs molecules. The main aim of this work was to test different protocols to extract total RNA from leaves and roots of brachiariagrass. Seeds of Brachiaria decumbens cv. Basilisk were germinated and 12-day seedlings were used. The RNA extractions were done in duplicate with 200 mg of samples of leaves or roots pulverized with liquid nitrogen. For the RNA extractions from leaves Trizol[®] and Brazol[®] reagents were tested and for the RNA extraction from roots these two reagents plus two commercial kits: SV Wizard Isolation RNA system (Promega[®]) and Invisorb Spin Plant RNA Mini Kit (Invitek[®]) were tested. ANOVA and Tukey test (1% of significance) were used to compare the means of the concentrations and of the quality from the RNA samples extracted. The results showed non-significant differences among the concentrations and the quality of RNA extracted from leaves using Trizol[®] and Brazol[®] reagents. However, for roots the concentrations and quality of RNA isolated were significantly different, and Trizol[®] was the most efficient. The two kits isolated RNA with lower concentrations and quality than

RNA obtained by use of the two reagents. For synthesis of complementary DNA (cDNA) two enzymes were tested: SuperScript RTII (Invitrogen®) and M-MLV-RT (Sigma®), and this last was more efficient, since it produced high quantity and quality of cDNA, with relation the presence of contaminants. These results can be considered as a starting point for studies about gene expression in Brachiaria species.

Index terms: Brachiaria, genetic expression, ribonucleic acid, tropical forage grasses, Urochloa.

Introdução

A extração de ácidos nucleicos (DNA e RNA) é o primeiro passo para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. É possível se obter DNA e RNA a partir de inúmeros tipos de tecidos e células, e existe uma infinidade de protocolos e reagentes para realização de tal procedimento (GOUVEIA; REGITANO, 2007).

A análise de RNA pode fornecer informações importantes sobre expressão gênica e caracterização de transcritos, baseado nos métodos de Northern, PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), construção de bibliotecas de cDNA, ESTs, e outras (IBELLI et al. 2007), para a realização desses estudos é necessário que o RNA seja extraído e purificado eficientemente, mantendo sua integridade e qualidade.

Devido à presença de grandes quantidades e variedades de compostos secundários nos tecidos vegetais, não existe um método padrão para o isolamento de ácidos nucleicos (RNA ou DNA) que possa ser utilizado para todas as espécies de plantas (CARDILLO et al., 2006). A presença de polissacarídeos, polifenóis e uma grande gama de metabólitos secundários tornam difícil a padronização entre os diferentes tecidos e a obtenção de RNA de alta qualidade (CAMPOS et al., 2010).

Os métodos para isolamento de RNA baseiam-se na lise e na desnaturação das células que permitem a liberação dos ácidos nucleicos totais e na presença de inibidores que impedem a ação de ribonucleases (RNases) (AUSUBEL et al., 1998).

A presença de RNases estáveis e ativas nos tecidos é a principal dificuldade na extração de RNA, pois fazem com que o RNA (altamente instável) seja rapidamente degradado. Sendo assim, a primeira etapa na maioria dos métodos de isolamento de RNA após a pulverização dos tecidos, é a imediata exposição deste material a tampões de extração que apresentam substâncias como o cloreto de lítio, que auxilia a precipitação do RNA, e o isotiocianato de guanidina, que permite a manutenção

do RNA intacto nas etapas posteriores da extração por meio da degradação das ribonucleases endógenas (SAMBROOK ; RUSSEL, 2002).

Atualmente, há vários reagentes comercialmente disponíveis que possuem em sua composição reagentes combinados, como isotiocianato de guanidina e fenol, possibilitando uma extração de RNA mais rápida que a dos protocolos convencionais e garantindo a integridade do material. É necessária ainda a adição de clorofórmio ao RNA, que solubiliza os lipídios permitindo a sua remoção. Após a centrifugação, três fases podem ser observadas: uma rósea formada pela presença do fenol; uma interfase formada pelo clorofórmio; e DNA e uma fase aquosa, onde está presente o RNA. A precipitação do RNA é feita com um álcool, como por exemplo, o isopropanol. Nesta etapa, observa-se uma nuvem branca contendo o RNA. Posteriormente, uma limpeza com álcool permite a retirada de sais que tenham ainda aderido ao precipitado de RNA (AUSUBEL et al., 1998).

Comercialmente existem ainda muitos kits que prometem a extração de RNA de alta qualidade a partir de pequenas quantidades de material biológico. Muitos desses kits são bastante eficientes, mas necessitam ser testados para o tecido que se deseja trabalhar e para determinada espécie.

Diversos estudos descrevem diferentes protocolos de extração para diferentes tecidos vegetais ricos em polifenóis ou polissacarídeos, que são os tecidos que impõem uma maior dificuldade para isolamento de boa quantidade de RNA e de alta qualidade. Entretanto, esses estudos desenvolvem métodos tecidos-específicos e, geralmente, para uma única espécie (AZEVEDO et al., 2003).

O gênero *Brachiaria* possui várias espécies com interesse forrageiro contribuindo efetivamente na produção de carne e leite do Brasil. Somente na região dos Cerrados, as espécies de *Brachiaria* somam mais de 50 milhões de hectares, totalizando 85% das gramíneas forrageiras cultivadas neste ecossistema (MACEDO, 2005). Nos últimos anos, o in-

teresse por essa gramínea vem crescendo devido ao seu grande potencial de adaptabilidade a condições extremas de clima e solo, inclusive na área de genômica e proteômica, com vistas a prospectar genes de interesse relacionados à resistência/tolerância a esses estresses.

Dentro deste contexto, o objetivo com este trabalho foi avaliar diferentes protocolos para a extração de RNA total a partir de folhas e raízes de *Brachiaria* para auxiliar na realização de estudos de expressão gênica e caracterização de transcritos.

Material e Métodos

Preparo do material vegetal

Cem sementes de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk foram germinadas em caixas plásticas tipo gerbox, previamente esterilizadas com hipoclorito de sódio 2%, usando papel germitest estéril umedecidos com água destilada também estéril, em câmaras de crescimento tipo BOD com temperatura controlada e alternada, 15°C e 35°C, e fotoperíodo de 12 horas, segundo Brasil (1992).

Plântulas com 12 dias tiveram suas folhas e raízes separadas, lavadas com H₂O DECP (água Milli-Q tratada com dietilpirocarbonato 0,01%) e maceradas com nitrogênio líquido. Duzentos miligramas do pó fino obtido foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 2,0 mL para a realização das extrações de RNA.

Protocolos utilizados para a extração de RNA

1. Extração de RNA de folhas e raízes de braquiária utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®)

O protocolo utilizado seguiu as instruções do fabricante. Desta forma, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol® (mantido a 4°C) ao tecido pulverizado e, com auxílio de um agitador de tubos do tipo vortex, homogeneizou-se durante 1 minuto. Depois, as amostras foram mantidas por 5 min. a temperatura ambiente (TA – 23°C a 25°C) para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicio-

nados 200 μ L de clorofórmio gelado (mantido a 4°C) (1:5 v/v clorofórmio; Trizol[®]) as amostras, que foram homogeneizadas em equipamento tipo vortex (“vortexadas”) por 1 min. e, após, incubadas por 3 minutos a TA. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min. a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi transferido para um novo tubo de 2 mL (o RNA total encontra-se exclusivamente nessa fase).

Para precipitação do RNA foram adicionados 500 μ L de isopropanol (mantido a -20°C) (1:2 v/v, isopropanol e Trizol[®] utilizado no início). Os tubos foram agitados cuidadosamente, por inversão, durante 2 min. e mantidos a TA por 8 minutos. Depois, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 min. a 4°C e o RNA precipitado, até então invisível, formou um sedimento gelatinoso no fundo do tubo (“pellet”). O sobrenadante foi descartado e esse precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (mantido a 4°C) (1:1 v/v, etanol 75% e Trizol[®] utilizado no início). As amostras foram centrifugadas a 7.500 g por 5 min. a 4°C e o sobrenadante foi imediatamente descartado. O precipitado foi seco por cerca de 10 min. a TA e depois eluído em 50 μ L de H₂O DEPC. Para auxiliar a eluição do RNA os tubos podem ser colocados a 37°C por cerca de 1 hora. O RNA isolado foi quantificado e, depois, estocado em ultrafreezer (-80°C).

2. Extração de RNA de folhas e raízes de braquiária utilizando o reagente Brazol[®] (LGC Biotecnologia)

Foram seguidas as instruções do fabricante, como segue:

Adicionou-se aos 200 mg de tecido pulverizado 1 mL do reagente Brazol[®] (mantido a 4°C) e fez-se uma homogeneização “vortexando” por 1 minuto. Depois, as amostras permaneceram por 5 min. a TA para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas e, passado esse período, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (mantido a 4°C) (1:5 v/v, clorofórmio e Brazol[®] utilizado no início). As amostras foram “vortexadas” por 1 min. e, novamente, incubadas em TA por 3 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 min. a 4°C e o sobrenadante (fase aquosa) foi trans-

ferido para um novo tubo de 2 mL. Adicionou-se a esse sobrenadante 500 μ L de isopropanol (1:2 v/v, isopropanol e Brazol[®] utilizado no início) e os tubos foram agitados cuidadosamente, por inversão, durante 2 min. e, depois, foram mantidos em TA por 8 minutos. Novamente as amostras foram centrifugadas a 12.000 g, agora por 10 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado (1:1 v/v, etanol 75% e Brazol[®] utilizado no início). Após centrifugação a 7.500xg por 5 min. a 4°C, o sobrenadante foi descartado imediatamente e o “pellet” foi seco por cerca de 10 min. a TA. Para eluir o precipitado adicionou-se 50 μ L de H₂O DEPC. Nessa fase, para auxiliar a eluição do RNA, os tubos foram colocados a 37°C por cerca de 1 hora. O RNA isolado foi quantificado e, depois, estocado a -80°C.

3. Extração de RNA de raízes de braquiária utilizando o kit SV Wizard Isolation RNA System (Promega[®])

Os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Aos 200 mg de material pulverizado adicionaram-se 175 μ L de Tampão de Lise e 350 μ L de Tampão de Diluição e misturou-se por inversão durante 2 minutos. As amostras foram, então, centrifugadas a 12.000 g por 10 min. e os sobrenadantes transferidos para um tubo novo de 2 mL. Depois, 200 μ L de etanol 95% foram adicionados às amostras que foram misturadas por pipetagem (3 a 4 pipetagens). Essa mistura foi transferida para uma coluna, fornecida no kit, que foi primeiramente acoplada a um tubo coletor, também fornecido. Centrifugou-se a 12.000 g por 1 minuto e o líquido que passou para o tubo coletor foi descartado.

À coluna foram adicionados 600 μ L de Solução de Lavagem e, novamente, centrifugou-se por 1 min. a 12.000 g. O líquido que atravessou a coluna foi descartado. Após, adicionou-se à coluna 50 μ L de uma solução de incubação DNase I. Esta solução foi preparada imediatamente antes de ser utilizada pela adição de 40 μ L de Tampão de Coloração Amarelo, 5 μ L MnCl₂ 0,09 M e 5 μ L de DNase I (que deve ser descongelada no gelo para uso). Deve ser preparada apenas a quantidade necessária para uso e esta deve ser misturada cuidadosamente por

pipetagem. Adicionar a solução à coluna tomando cuidado para que ela entre em contato com a cobertura da membrana (a solução de incubação DNase I é amarela para facilitar essa visualização). Após essa adição, a coluna foi incubada a TA durante 15 minutos. Foram, então, adicionados a 200 μL de Solução de Inibição da DNase I e centrifugou-se a 12.000 g por 1 minuto.

Iniciaram-se as etapas de lavagem da coluna com a adição de 600 μL de Solução de Lavagem. Foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 1 min. e, depois, adicionou-se mais 250 μL de Solução de Lavagem e fez-se nova centrifugação por mais 2 minutos (nessas etapas de lavagem não foi necessário o descarte do líquido que atravessou a coluna).

A coluna foi transferida agora para um microtubo de 1,5 mL. Adicionaram-se à coluna 50 μL de água livre de nuclease, fornecida no kit (certifique-se de cobrir completamente a superfície da membrana com a água). Após, foi feita uma nova centrifugação a 12.000 g por 1 min. e a coluna foi descartada. O RNA purificado foi quantificado e estocado a -80°C .

4. Extração de RNA de raízes de braquiária utilizando o kit Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex®)

Nesse kit foram fornecidas, pelo fabricante, duas soluções de lise (DCT e RP) que foram testadas para ver qual é a mais indicada à extração de RNA de raízes de braquiária. Para os testes foram seguidas as instruções fornecidas pelo fabricante:

Aos 200 mg de material pulverizado foram adicionados 900 μL de DCT ou RP que foi bem misturado por “vortexação”. As amostras foram incubadas por 15 min. a TA sob constante agitação, foi utilizado agitador orbital horizontal (“shaker”) a 200 RPM.

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 1 min. e um precipitado foi obtido. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um pré-filtro acoplado a um tubo coletor (fornecidos) e,

depois, centrifugados por 1 min. a 7.000 g. O pré-filtro foi descartado e ao filtrado (cerca de 800 μL), que contém o RNA, foram adicionados 500 μL de etanol absoluto. Tudo foi misturado muito bem por pipetagem e, após, 750 μL desse lisado foram transferidos para uma coluna acoplada a um tubo coletor (fornecidos). Novamente as amostras foram incubadas por 1 min. e centrifugadas a 7.000 g também por 1 minuto. O líquido que ultrapassou o tubo coletor foi descartado, novamente acoplou-se a coluna ao mesmo tubo e centrifugou-se por mais 1 minuto.

Para a lavagem da coluna foram adicionados 500 μL de Tampão de Lavagem R1 e centrifugou-se durante 30 seg. a 7.000 g. O líquido que ultrapassou a coluna foi descartado e foram adicionados à coluna 700 μL de Tampão de Lavagem R2. Após nova centrifugação também por 30 seg. a 7.000 g, descartou-se o líquido do tubo coletor e essas lavagem com R1 e R2 foram repetidas mais uma vez. Para eliminar qualquer vestígio de etanol, ao final da última lavagem centrifugou-se por um tempo maior (3 min.).

A coluna foi acoplada em um microtubo de 1,5 mL e foram adicionados 50 μL de Tampão de Eluição R diretamente na membrana da coluna, que foi incubada por 2 min. e, depois, centrifugada por 1 min. a 7.000 g. Ao final, descartou-se a coluna e o RNA total eluído foi quantificado e estocado a -80°C .

Quantificação das amostras de RNA

A quantificação das amostras de RNA foi realizada por espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo)®, sendo a concentração calculada em $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ através da fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times Fc \times fd$$

Onde A_{260} corresponde ao valor de absorvância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm; Fc corresponde ao fator de conversão que para RNA é 40; fd corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, que neste caso foi de 100; e o resultado é a concentração em $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do RNA foi analisada com base na razão da absorvância $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, a 1% de significância. Foram feitas duas repetições da extração de RNA de cada amostra por protocolo utilizado.

Eletroforese do RNA isolado

Para verificar a integridade do RNA extraído as amostras foram analisadas em gel de agarose desnaturante (Agarose 1,2%; Água DEPC; Tampão 10X MOPS MOPS (0,2 M de 3-[N-morpholino]propanesulfonic acid)/Acetato/EDTA; Formaldeído 37%) e não-desnaturante (Agarose 1%; Tampão TBE 1X). Os dois tipos de géis foram pré-corados com brometo de etídio (0,5 mg/mL) e a eletroforese procedeu a 100 V por cerca de uma hora. Os géis foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta em sistema digital L-Pix Image (Loccus Biotecnologia).

Síntese do DNA complementar (cDNA)

1. Síntese de cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa M-MLV-RT do GeneSnare Differential Expression kit Sigma®

As reações foram preparadas com todos os reagentes fornecidos e seguindo o protocolo do fabricante. Foram utilizados microtubos de 0,2 mL, mas podem ser utilizadas placas de PCR dependendo do volume de reações. Os reagentes foram adicionados em duas etapas como segue:

Na primeira etapa foram adicionados de 4 a 8 μL de RNA, essa quantidade variou de acordo com a quantificação das amostras de forma que fossem adicionados 3 μg ; 2 μL de ACP-primer; e 10 a 14 μL de água livre de nucleases. O volume final foi igual a 20 μL . Essas reações foram colocadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) programado para 10 min. a 70°C e 1 min. a 4°C.

Na segunda etapa foram adicionados aos mesmos microtubos 21 μL de água livre de nucleases; 5 μL de Tampão da Enzima M-MLV-RT; 2 μL de dNTP; 1 μL de Inibidor RNase; e 1 μL da Enzima M-MLV-RT. O volume final foi de 50 μL . As reações foram colocadas no mesmo termociclador programado para: 42°C por 50 min., depois 94°C por 3 min. e for fim 4°C. Os cDNAs foram quantificados e armazenados a -80°C.

2. Síntese de cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa SuperScript RT II Invitrogen®

As reações foram preparadas em três etapas, utilizando os reagentes fornecidos pelo fabricante e seguindo suas instruções. Também foram utilizados microtubos de 0,2 mL, mas podem ser utilizadas placas de PCR.

Primeiramente, adicionou-se 1 a 9 μL de RNA, de modo a se obter a concentração final de 3 μg ; 1 μL de oligo dT e água milliQ estéril se for necessário para completar o volume para 10 μL . As reações foram colocadas no termociclador MJ Research PTC-100 programado para 65°C por 5 min. e depois os tubos foram transferidos para o gelo e permaneceram por 1 minuto. Após, foi feita uma rápida centrifugação na velocidade máxima por 10 seg. e reservaram-se os tubos.

Foram, então, adicionados a novos microtubos de 0,2 mL (ou placas): 2 μL de Tampão da Enzima SuperScript RT II; 4 μL de MgCl_2 ; 1 μL de RNase out e 9 μL da reação reservada da primeira etapa. Os tubos foram incubados a 42°C por 2 minutos no termociclador ou banho-maria.

Na terceira etapa adicionou-se 1 μL da Enzima SuperScript RT II e as reações foram colocadas em um termociclador programado para 42°C por 50 min.; 70°C por 15 min.; baixando para 4°C. Nesse momento foi adicionado 1 μL de RNase H às reações que foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Os cDNAs foram quantificados e estocados a -80°C.

Quantificação das amostras de cDNA

A quantificação das amostras de cDNA foi realizada por espectrofotômetro NanoDrop® (Thermo)®, sendo a concentração calculada em $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ através da fórmula:

$$[\text{DNA}] = A_{260} \times F_c \times f_d$$

Onde A_{260} corresponde ao valor de absorbância da amostra ao comprimento de onda de 260 nm; F_c corresponde ao fator de conversão

que para cDNA é 33; fd corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura, que neste caso foi de 100; e o resultado é a concentração em $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do DNA foi analisada com base na razão da absorvância $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, a 1% de significância. Foram feitas duas repetições por protocolo utilizado.

Resultados e discussão

As concentrações das amostras de RNA obtidas a partir de folhas de *B. decumbens* cv. Basilisk foram em média: 1131,1 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ quando o reagente Trizol[®] foi utilizado e 860,84 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ quando utilizou-se Brazol[®]. A qualidade desses RNAs foi determinada pelas médias da relação $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ que ficaram dentro da faixa de boa qualidade (1,6 a 2,0) apresentada por Sambrook e Russel (2002). Não houve diferença significativa ($P > 0,01$) entre essas médias (Tabela 1).

Tabela 1 - Comparação entre as médias das concentrações e das relações $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ obtida das amostras de RNA extraídos de folhas de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk utilizando os reagentes Trizol[®] e Brazol[®]

Teste de Tukey (1% de significância)		
Protocolos	$\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	$A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$
Trizol [®]	1131,10 A	1,66 A
Brazol [®]	860,84 A	1,63 A

As concentrações das amostras de RNA isoladas de raízes foram em média: 2662,45 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ com o reagente Trizol[®]; 1709,15 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ para o Brazol[®]; 107,93 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ usando o kit Promega; 56,76 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ com o kit Invitek usando o tampão RP e 32,07 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ usando o tampão DCT. Essas médias foram significativamente diferentes ($P < 0,01$). O reagente Trizol[®] foi o mais eficiente, pois extraiu maior quantidade de RNA, seguido pelo reagente Brazol[®] e, por fim, os kits Promega[®] e Invitek[®] (Tabela 2).

As médias das relações $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$, que determinam a qualidade das amostras de RNA, ficaram dentro da faixa de qualidade (1,6 a 2,0) quando os reagentes foram utilizados e não diferiram significativamente ($P > 0,01$). Entretanto, quando os kits foram utilizados para a extração de RNA a partir de raízes houve diferença estatística com relação às médias dos reagentes ($P < 0,01$) e a relação $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ foi superior a 2,0, indicando menor qualidade dessas amostras de RNA (Tabela 2).

Tabela 2 - Comparação entre as médias das concentrações e das relações $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ obtida das amostras de RNA extraídos de raízes de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk utilizando os reagentes Trizol[®], Brazol[®], kit Promega[®], kit Invitek[®] com o Tampão RT e kit Invitek[®] com o Tampão DCT

Teste de Tukey (1% de significância)		
Protocolos	ng. μL^{-1}	$A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$
Trizol [®]	2662,45 A	1,65 B
Brazol [®]	1709,15 B	1,69 B
Invitek [®] (Tampão RP)	107,93 C	2,31 A
Promega [®]	56,76 C	2,10 A
Invitek [®] (Tampão DCT)	32,07 C	2,38 A

Para analisar a integridade das amostras de RNA foi realizada a visualização eletroforética em géis de agarose 1,2% desnaturante e 1% não-desnaturante. Foi possível observar a separação das bandas dos diferentes tipos de RNAs para todos os reagentes e kits utilizados nas extrações. Além disso, pela análise dos géis não se observou DNA nessas amostras. A figura 1 exemplifica resultados amostras de RNA obtidas a partir de raízes utilizando o reagente Trizol[®].

Para testar a eficiência de duas enzimas transcriptases reversas comerciais (SuperScript RTII e M-MLV-RT) na síntese de cDNA utilizou-se amostras de RNA extraídas de raízes com o reagente Trizol[®]. Houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre as médias das concentrações de cDNA obtidas com as diferentes enzimas. A enzima M-MLV-RT sintetizou cDNA em maior quantidade que a SuperScript

RTII. As médias das relações de absorvâncias $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ também foram significativamente distintas ($P < 0,01$) e ficaram pouco abaixo de 1,8 (Tabela 3). Segundo Sambrook e Russel (2002), em um DNA de qualidade a relação $A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$ deve estar na faixa de 1,8 a 2,0 e valores abaixo de 1,8 significam contaminação por proteínas. A enzima M-MLV-RT apresentou esta relação mais próxima de 1,8 que a SuperScript RTII.

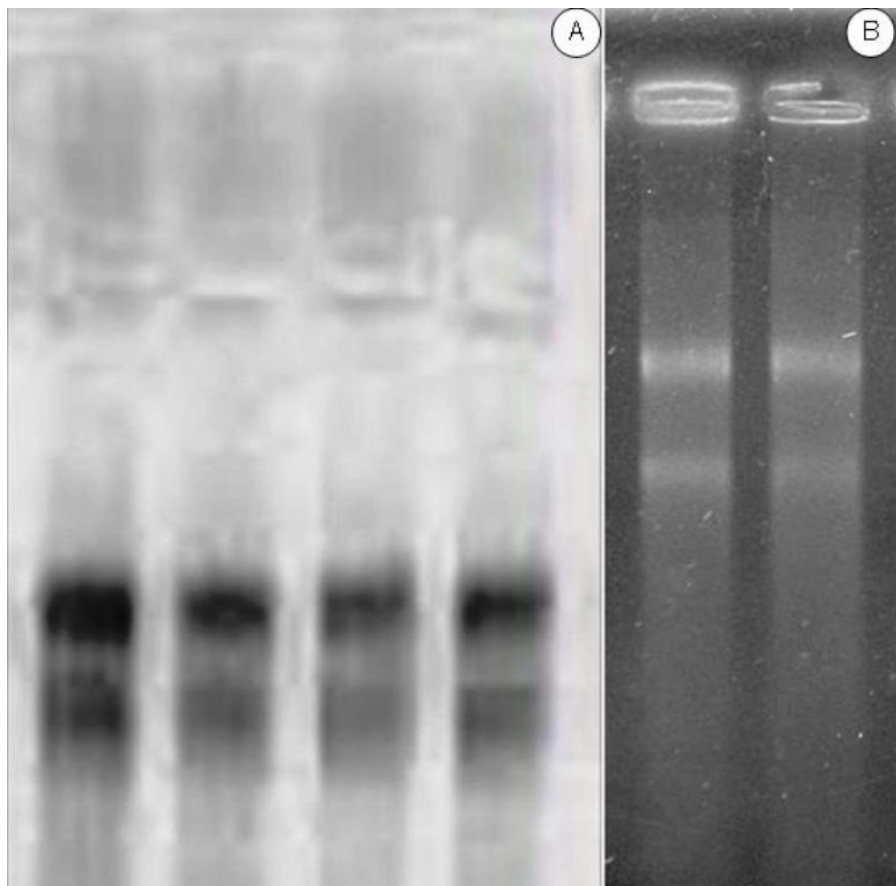


Figura 1. Exemplo do perfil eletroforético de amostras de RNAs obtidas a partir de raízes de *B. decumbens* cv. Basilisk com o uso do reagente Trizol[®]. As bandas observadas, de cima para baixo, são os RNAs 28S, 18S e 5S. A) gel desnaturante 1,2%; e B) gel de agarose 1% (não-desnaturante).

Tabela 3 - Comparação entre as médias dos cDNAs sintetizados com as duas enzimas transcriptase reversa (SuperScript RTII e M-MLV-RT)

Teste de Tukey		
Enzimas	ng. μ L ⁻¹	A _{260nm} / A _{280nm}
M-MLV-RT	1307,92 A	1,84 A
SuperScript RTII	1081,10 B	1,69 B

Conclusões

Pode-se concluir com base nos experimentos realizados neste trabalho que os reagentes Trizol[®] e Brazol[®] são igualmente eficientes na extração de RNA a partir de folhas de braquiária, porém, quando são utilizadas raízes, o Trizol[®] é mais eficiente. Ademais, esses dois reagentes são mais eficazes para a extração de RNA de raízes que aos dois kits comerciais testados. Os resultados denotam, ainda, que a enzima M-MLV-RT é mais eficiente na obtenção de cDNA de qualidade que a SuperScript RTII.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida à primeira autora e a bióloga Gisele Olivas de Campos Leguizamón, técnica do laboratório de Biotecnologia Vegetal da Embrapa Gado de Corte, pelo auxílio prestado no desenvolvimento deste trabalho.

Referências bibliográficas

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Eds.) **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons, New York. 1998.

AZEVEDO, H.; LINO-NETO, T.; TAVARES, R. M. An improved method for high quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 21, n. 4, p. 333-338, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CAMPOS, N. A.; ALVES, J. D.; PORTO, B. N.; SOUZA, K. R. D.; SANTOS, M. O.; SILVEIRA, H. R. O; MAGALHÃES, M. M. Otimização de protocolos de extração de RNA de raiz de milho (*Zea mays*) visando estudos moleculares de alta sensibilidade. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 28., 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2010. p.97-104. 1 CD-Rom.

CARDILLO, A. B.; GIULIETTI, A. M.; MARCONI, P. L. Analysis and sequencing of h6hmRNA, last enzyme in the tropane alkaloids pathway from anthers and hairy root cultures of *Brugmansia candida* (Solanaceae). **Electronic Journal of Biotechnology**, Cambridge, v. 9, n. 3, p. 196-198, 2006.

GOUVEIA, J. J. de S.; REGITANO, L. C. de A. Extração de DNA. 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. 3-8. 1 CD-ROM.

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. 1 CD-ROM.

MACEDO, M. C. M. Pastagens no ecossistema Cerrados: evolução das pesquisas para o desenvolvimento sustentável. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42., 2005, Goiânia. **A produção animal e o foco no agronegócio: anais**. Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia: Universidade Federal de Goiás, 2005. p. 56-84.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002. 2.700 p.



Gado de Corte

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

**Governo
Federal**

CGPE 9653