

**Protocolo de Extração de RNA Total de *Arachis* spp. e Avaliação do Efeito de Contaminantes por meio de Análises Espectrofotométricas**



ISSN 1808-9968

Dezembro, 2015

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

# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*** 121

## **Protocolo de Extração de RNA Total de *Arachis* spp. e Avaliação do Efeito de Contaminantes por meio de Análises Espectrofotométricas**

*Carolina Vianna Morgante  
Andressa da Cunha Quintana Martins  
Amanda Kristina Silva  
Thaís Nicolini de Oliveira  
Patrícia Messenberg Guimarães  
Ana Cristina Miranda Brasileiro*

Embrapa Semiárido  
Petrolina, PE  
2015

Esta publicação está disponibilizada no endereço:  
<http://www.embrapa.br/semiarido>

Exemplares da mesma podem ser adquiridos na:

### **Embrapa Semiárido**

BR 428, km 152, Zona Rural

Caixa Postal 23, 56302-970 Petrolina-PE

Fone (87) 3866-3600; Fax: (87) 3866-3815

<http://www.embrapa.br/fale-conosco/sac/>

### **Comitê de Publicações da Embrapa Semiárido**

Presidente: Flávio de França Souza

Secretária Executiva: Lúcia Helena Piedade Kiill

Membros:

Alessandra Monteiro Salviano      Fernanda Muniz Bez Birolo

Diana Signor Deon                      Mizael Félix da Silva Neto

Francislene Angelotti                  Pedro Martins Ribeiro Júnior

Gislene Feitosa Brito Gama            Rafaela Priscila Antonio

José Maria Pinto                        Roseli Freire de Melo

Juliana Martins Ribeiro                Salete Alves de Moraes

Supervisor Editorial: Sidinei Anuniação Silva

Revisor de Texto: Sidinei Anuniação Silva

Normalização Bibliográfica: Sidinei Anuniação Silva

Foto da Capa: Carolina Vianna Morgante

Editoração Eletrônica: Nivaldo Torres dos Santos

**1ª edição** (2015): formato digital

Todos os direitos reservados.

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

É permitida a reprodução parcial do conteúdo desta publicação desde que citada a fonte.

CIP - Brasil. Catalogação na publicação  
Embrapa Semiárido

---

Protocolo de extração de RNA total de *Arachis* spp. e avaliação do efeito de contaminantes por meio de análises espectrofotométricas / Carolina Vianna Morgante... [et al.]. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2015.

25 p. il. (Embrapa Semiárido. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 121).

1. Amendoim. 2. Genética vegetal. 3. Espectrofotometria. I. Morgante, Carolina Viana. II. Martins, Andressa da Cunha Quintana. III. Silva, Amanda Kristina. IV. Oliveira, Thaís Nicolini de. V. Guimarães, Patrícia Messenberg. VI. Brasileiro, Ana Cristina Miranda. VII. Título. VIII. Série.

---

CDD 633.368

© Embrapa 2015

# Sumário

<b>Resumo</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	6
<b>Introdução</b> .....	7
<b>Material e Métodos</b> .....	12
<b>Resultados e Discussão</b> .....	14
<b>Conclusão</b> .....	23
<b>Referências</b> .....	23

# Protocolo de Extração de RNA Total de *Arachis* spp. e Avaliação do Efeito de Contaminantes por meio de Análises Espectrofotométricas

---

*Carolina Vianna Morgante*<sup>1</sup>

*Andressa da Cunha Quintana Martins*<sup>2</sup>

*Amanda Kristina Silva*<sup>3</sup>

*Thaís Nicolini de Oliveira*<sup>3</sup>

*Patrícia Messenberg Guimarães*<sup>4</sup>

*Ana Cristina Miranda Brasileiro*<sup>5</sup>

## Resumo

Apesar de as tecnologias hoje disponíveis para a avaliação da expressão gênica oferecerem métodos mais simplificados, automatizados e com maior reprodutibilidade, a extração de RNA total a partir de tecidos vegetais, principalmente daqueles ricos em metabólitos secundários, ainda é uma etapa crítica e muitas vezes limitante ao processo.

Considerando-se o crescente número de estudos genômicos de leguminosas, em especial de amendoim, a quinta oleaginosa mais cultivada no mundo e importante fonte de proteínas, este trabalho teve como objetivos descrever um protocolo para a extração de RNA total a partir de folhas e raízes de *Arachis* spp. e fornecer um guia para a análise qualitativa de RNA total por espectrofotometria para a identificação de contaminantes presentes em amostras de *Arachis* spp.

<sup>1</sup>Bióloga, D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

<sup>2</sup>Bióloga, M.Sc. Fitopatologia, bolsista DTI da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>3</sup>Estudante de Agronomia, Universidade de Brasília, estagiária da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>3</sup>Engenheira-agrônoma, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>4</sup>Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Biologia Molecular, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

<sup>5</sup>Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Biologia Molecular e Celular Vegetal, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

Para tanto, as amostras foram intencionalmente contaminadas com reagentes comumente utilizados em protocolos de extração de ácidos nucleicos. Os resultados revelaram que contaminações com álcool etílico, álcool isopropílico, clorofórmio ou Tris não alteraram a qualidade e a quantificação do RNA. Contaminações com fenol, tiocianato de guanidina, CTAB e BSA geraram anormalidades na quantificação. Esses resultados podem ser utilizados como referência na quantificação de RNA total de plantas pelo método de espectrofotometria para a detecção de anormalidades nas amostras e identificação de possíveis contaminantes.

**Termos para indexação:** ácido nucleico, amendoim, espectrofotometria.

# Total RNA extraction protocol from *Arachis* spp and evaluation of the effect of contaminants by spectrophotometric analysis

---

## Abstract

Despite the automated, simplified and reproducible methods available for gene expression analyses, the RNA isolation from plant tissues is still a critical step and could be a limitation for these procedures, especially for species rich in secondary metabolites. Taking into account the advances in legume genomics, especially in peanut, the fifth-largest oilseed crop in the world and an important source of protein, the purpose of this work was to describe a protocol for isolation of total RNA from leaves and roots of *Arachis* spp and provide a guide for total RNA qualitative analyses, in samples exposed to distinct contaminants by spectrophotometry. Total RNA samples were intentionally contaminated with reagents frequently used for nucleic acid isolation. Results revealed that contamination with ethanol, isopropanol, chloroform, and Tris did not alter the quantification and evaluation of the quality of the total RNA samples. Nevertheless, the method was able to detect contamination with phenol, guanidine thiocyanate, CTAB, and BSA. These results can be used as a reference for plant total RNA quantification by spectrophotometry, allowing the detection of sample abnormalities and contaminant identification.

**Index terms:** nucleic acid, groundnut, spectrophotometry.

## Introdução

Os avanços no desenvolvimento de métodos de sequenciamento e análise de expressão gênica possibilitam a geração de dados em grande escala, com maior reprodutibilidade e precisão. O progresso contínuo dessas técnicas, associado aos avanços da área de bioinformática, permite um melhor entendimento no âmbito genômico, de mecanismos fisiológicos e de desenvolvimento de plantas, frequentemente associados à resistência a estresses bióticos e abióticos e produtividade, características relevantes em programas de melhoramento vegetal.

Técnicas, como RNA-seq, microarranjos e PCR em tempo real, são frequentemente utilizadas para quantificar níveis de RNA mensageiro (mRNA) em estudos de expressão gênica (LUKENS; ZHAN, 2011; VIJAY et al., 2013). Apesar de essas tecnologias oferecerem métodos menos laboriosos, automatizados e com maior reprodutibilidade para a quantificação de transcritos, o risco de degradação da molécula de RNA durante sua manipulação, por causa da sua alta instabilidade, continua sendo um grande desafio para o sucesso das análises de transcrito.

No mercado, estão disponíveis diversos kits para o isolamento de RNA de tecidos variados de plantas, a grande maioria baseada no princípio da capacidade de ligação do RNA a uma resina de gel de sílica presente em uma coluna, a depender da concentração salina. No entanto, além de serem onerosos, esses kits, muitas vezes, não proporcionam bom rendimento, principalmente por serem padronizados para o isolamento de plantas modelo, como *Arabidopsis thaliana*. A grande diversidade de composição química entre plantas, e até mesmo entre tecidos de uma mesma espécie, faz com que sejam necessárias otimizações nos protocolos de extração de RNA total para cada genótipo ou tipo de tecido. Muitas plantas são ricas em polissacarídeos, proteínas de reservas ou compostos secundários que se ligam e coprecipitam com o RNA durante sua extração, comprometendo sua pureza (SALZMAN et al., 1999). Os compostos fenólicos e outros compostos secundários,



também presentes em muitas espécies vegetais, sofrem oxidação, formando quinonas, as quais se ligam ao RNA promovendo sua degradação (GHAWANA et al., 2011). Outra limitação à extração de RNA de plantas refere-se a barreiras físicas, tais como a presença de cutículas espessas, pelos, espinhos, tubérculos, tecidos fibrosos ou sementes e grãos duros que oferecem resistência à maceração completa do material vegetal, o que também interfere na qualidade final do RNA isolado. Diante dessas particularidades, é impossível a recomendação de um protocolo universal para a extração de RNA de plantas.

Diversos métodos para a extração de RNA total de plantas, que não envolvem a utilização de kits comerciais, estão descritos na literatura (BILGIN et al., 2009) e apresentam as vantagens de serem menos onerosos e permitirem maior flexibilidade para otimizações das etapas, a depender do material biológico utilizado. Esses protocolos incluem, em geral, etapas de maceração do tecido em nitrogênio líquido e de homogeneização do macerado em tampão específico, com posterior separação de outros componentes celulares, precipitação, lavagem e recuperação do RNA total.

O sucesso na obtenção de RNA íntegro depende da rápida inativação de RNases endógenas já nas etapas iniciais do procedimento, em que as células são rompidas e nucleases celulares têm acesso a ácidos nucleicos, para que seja afastado o risco de degradação (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Uma vez inativadas as RNases endógenas, cuidados adicionais, como a limpeza da área de trabalho com álcool 70%, o uso de luvas durante a manipulação, água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) 0,1 % (v/v) para o preparo de soluções e ressuspensão do RNA e ponteiros e tubos esterilizados por autoclavagem, garantirão a obtenção de RNA de boa qualidade. Adicionalmente, para a inativação de RNases exógenas, espátulas e vidrarias podem ser lavadas com detergente, enxaguadas em água livre de RNases e aquecidas em forno a 240 °C por, no mínimo, 4 horas (AMBION, 2012).

A primeira etapa envolvendo a maceração dos tecidos vegetais é geralmente realizada em baixas temperaturas, utilizando-se nitrogênio líquido a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura na qual as RNases são inativas, uma vez que essas enzimas apresentam atividade detectável entre  $15\text{-}70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (TAKAHASHI et al., 1969). Outros protocolos sugerem a maceração do tecido diretamente em tampão de homogeneização contendo fortes agentes desnaturantes, tais como o tiocianato de guanidina, o qual rompe as células, solubilizando seus componentes, desnaturando e inibindo RNases endógenas simultaneamente.

Na maioria dos protocolos de extração de RNA são utilizados fenol e clorofórmio como agentes desnaturantes de proteínas, tornando-as solúveis na fase orgânica ou na interfase, enquanto ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa. O uso de fenol ácido, além de aumentar a força do tampão de homogeneização como desnaturante de RNase (BILGIN et al., 2009), também aumenta a solubilidade do RNA na fase aquosa e faz com que o DNA migre para a fase orgânica, contribuindo para a redução da contaminação por DNA genômico nas preparações de RNA (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 2006). Alguns protocolos sugerem o uso de fenol aquecido como forma de acelerar a desnaturação de proteínas, no entanto, esta prática não parece ser essencial ao sucesso da extração, uma vez que outros reagentes presentes no tampão de homogeneização desempenham a mesma função. O uso de fenol quente não é recomendável por medidas de segurança, pois seus vapores são tóxicos.

Dentre os reagentes frequentemente utilizados no tampão de homogeneização está o CTAB (brometo de hexadecil trimetil amônio), um detergente catiônico que remove efetivamente polissacarídeos de ácidos nucleicos e inibe a atividade da enzima polifenol oxidase, a qual promove oxidação e degradação do RNA (SUZUKI et al., 2008). Esse reagente é frequentemente utilizado na extração de RNA de espécies arbóreas e recalcitrantes (CHANG et al., 1993; WANG et al., 2008). O SDS (dodecil sulfato de sódio), também utilizado em protocolos de extração de RNA, é um detergente e forte agente desnaturante que atua na lise celular, rompendo as membranas celulares, desestabilizando as interações entre proteínas e ácidos nucleicos e inativando RNases (RIO et al., 2010). A ureia também pode ser utilizada no tampão como

agente desnaturante de RNases (ALMARZA et al., 2006). A adição de cloreto de sódio ao tampão de homogeneização aumenta a força iônica da solução e contribui para a separação de contaminantes do tecido vegetal (WANG et al., 2008). Ao tampão de homogeneização é também adicionado Tris [Tris-(hidroximetil)-aminometano], que mantém o pH em ponto estável, próximo a 8,0, e é capaz de interagir com lipopolissacarídeos, auxiliando na desestabilização de membranas celulares. O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), frequentemente adicionado a esse tampão, é um composto orgânico que age como agente quelante, interagindo fortemente com íons metálicos divalentes, promovendo a desestabilização de membranas e a proteção de ácidos nucleicos ao ataque de nucleases. Tris e EDTA são, também, frequentemente utilizados simultaneamente no tampão Tris-EDTA (TE) para a ressuspensão de ácidos nucleicos, de forma a mantê-los em pH estável e protegê-los da degradação.

A precipitação de ácidos nucleicos é, na maioria dos protocolos, realizada com um álcool, geralmente etanol 96% a 100% ou isopropanol 100%, na presença de sais como acetato de amônio ou de sódio. O cloreto de lítio é utilizado para precipitar, preferencialmente, o RNA de uma solução contendo DNA e RNA, o que permite reduzir a contaminação por DNA genômico, mas pode ter sua eficiência comprometida quando a concentração deste contaminante é alta (SMART; RODEN, 2010). RNAs de baixo peso molecular, como microRNA ou RNA transportador (tRNA), na ausência de etanol, são solúveis em soluções de alta força iônica, enquanto moléculas de RNA maiores são insolúveis. Por causa dessa diferença, a precipitação na presença de altas concentrações de cloreto de lítio (2 M a 4 M) pode ser usada para a purificação de RNAs de alto peso molecular, tais como RNAs mensageiro e ribossomal (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A estimativa da quantidade e qualidade do RNA isolado é frequentemente realizada via espectrofotometria. A leitura em um comprimento de onda correspondente a 260 nm é utilizada para mensurar a quantidade de ácidos nucleicos, uma vez que esse é o comprimento de onda de máxima absorvância dessas moléculas (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A razão entre as medidas a 260 nm

e 280 nm indica a pureza do RNA, sendo valores próximos a 2,0 considerados ideais (BARBAS III et al., 2007). Medidas inferiores para a razão 260/280 podem indicar contaminação por proteínas, fenóis ou outros compostos que absorvem luz próxima a 280 nm (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). A razão entre as leituras a 260 nm e 230 nm é utilizada de forma complementar para a avaliação da pureza do RNA. Para amostras de boa qualidade, esperam-se valores entre 2,0 e 2,2, e superiores ao obtido para a relação 260/280 (NANODROP, 2007). Valores abaixo dessa faixa podem indicar a presença de agentes contaminantes que absorvem luz a 230 nm, tais como EDTA, fenol, carboidrato, glicogênio ou guanidina (NANODROP, 2007). As medidas podem ser realizadas em espectrofotômetro com luz ultravioleta (UV) comum ou por nanoespectrofotômetros, que possuem a vantagem de mensurar diretamente a amostra a partir de 1  $\mu$ L, dispensando a necessidade de diluições e uso de cubeta. A desvantagem do método de espectrofotometria é que contaminantes também podem absorver luz no comprimento de onda selecionado e o valor final sofrer um desvio, podendo causar uma superestimativa da quantidade de RNA na amostra. Técnicas de quantificação que empregam o uso de fluoróforos que se ligam especificamente à molécula alvo permitem uma quantificação precisa de RNA, DNA dupla fita ou DNA fita simples, mesmo na presença de contaminantes. No entanto, essas técnicas são mais onerosas, uma vez que requerem equipamentos e reagentes específicos para as medidas.

Plantas de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) caracterizam-se por apresentar altos níveis de polissacarídeos, lipídeos e compostos secundários como polifenóis, que se ligam aos ácidos nucleicos e interferem no seu processo de isolamento (YIN et al., 2011). Métodos baseados no uso de kits comerciais ou de tiocianato de guanidina são pouco eficientes para o isolamento de DNA e RNA de *A. hypogaea*. No caso das espécies silvestres, nas quais a concentração de compostos secundários tende a ser maior, em relação à espécie cultivada (WINK, 1988), essa dificuldade é agravada.

Tendo em vista o crescente número de estudos genômicos de espécies de *Arachis* (PANDEY et al., 2012), motivados pela relevância do amendoim como a quinta oleaginosa mais cultivada no mundo e importante fonte de proteínas (FAO, 2013), neste trabalho é descrito um protocolo para o isolamento de RNA total a partir de folhas e raízes de *A. hypogaea* e duas espécies silvestres do gênero, *A. stenosperma* e *A. duranensis*, compatível com a aplicação para análises genômicas, tais como sequenciamento de segunda geração e análises de expressão gênica pelas técnicas de macroarranjos e PCR em tempo real. Objetivou-se, também, a geração de um guia para a análise qualitativa de RNA total, por espectrofotometria, para a identificação de contaminantes frequentemente encontrados em amostras de ácidos nucleicos.

## Material e Métodos

Amostras de RNA total foram isoladas a partir de folhas e de raízes de plantas de *A. hypogaea*, *A. duranensis* e *A. stenosperma*, com aproximadamente quatro semanas de idade, seguindo-se o protocolo descrito por (WILKINS; SMART, 1996), com modificações. O tecido vegetal foi coletado e armazenado em congelador a -80 °C. Cerca de 500 mg do tecido foram macerados em nitrogênio líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino e transferidos para um tubo de 15 mL de plástico polipropileno com fundo cônico, previamente resfriado em nitrogênio líquido. Foram adicionados 2,5 mL de tampão NTES (NaCl 0,1 M, Tris-HCl pH 8,0 0,01 M, EDTA 1 mM, SDS 1 % v/v) e volume igual (1 V) da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 v/v). Os tubos foram agitados vigorosamente em agitador do tipo Vortex e centrifugados durante 30 minutos, a 11.000 *g* e 4 °C. Transferiu-se, cuidadosamente por inversão, o sobrenadante para um novo tubo de 15 mL que foi centrifugado durante 20 minutos, a 11.000 *g* e 4 °C. O sobrenadante foi novamente transferido para um tubo de 15 mL no qual foi adicionado 1/10 do volume total de acetato de sódio 3M pH 4,5 e 2,5 volumes de etanol absoluto a 4 °C.

As amostras foram homogeneizadas manualmente e incubadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em congelador, durante 2 horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $11.000\text{ g}$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi descartado, por inversão do tubo. O precipitado obtido foi dissolvido em 1 mL de água ultrapura tratada com DEPC 0,1% (v/v), transferido para microtubo de polietileno de 1,5 mL e centrifugado a  $5.000\text{ g}$  durante 3 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi transferido, por inversão, para um microtubo de polietileno de 2 mL e foi adicionada igual quantidade do volume total de cloreto de lítio 4 M. As amostras foram agitadas e mantidas a  $4^{\circ}\text{C}$ , em geladeira, durante 14 horas e, em seguida, centrifugadas durante 20 minutos, a  $11.000\text{ g}$  e  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em  $500\text{ }\mu\text{L}$  de água ultrapura tratada com DEPC 0,1% (v/v). O RNA foi precipitado pela adição de  $50\text{ }\mu\text{L}$ , 1/10 do volume total, de acetato de sódio 3M e 1,25 mL (2,5 vezes do volume total) de etanol absoluto gelado. As amostras foram novamente centrifugadas durante 20 minutos, a  $10.000\text{ g}$  e  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante descartado. Em seguida, o precipitado foi lavado com  $500\text{ }\mu\text{L}$  de etanol 70 % (v/v), centrifugado por 5 minutos, a  $11.000\text{ g}$  e  $4^{\circ}\text{C}$  e o sobrenadante foi descartado. Após secar em temperatura ambiente, o precipitado foi ressuspenso em  $30\text{ }\mu\text{L}$  de DEPC 0,1 % (v/v). Após a extração, o RNA foi purificado utilizando-se kit de colunas de resina de gel de sílica e eluído em  $30\text{ }\mu\text{L}$  de água DEPC 0,1 % (v/v), conforme descrito por Morgante et al. (2009).

Para a eliminação do DNA genômico, as amostras foram digeridas com DNase I Turbo, de duas formas diferentes, conforme as opções sugeridas no manual do produto, obedecendo a proporção de 1 U da enzima para  $1\text{ }\mu\text{g}$  de RNA total: (1) após a eluição do RNA da coluna, adicionou-se a DNase I e o respectivo tampão, obedecendo-se as proporções indicadas pelo fabricante, e as amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 1 hora. Em seguida, a enzima foi inativada na presença de 15 mM de EDTA a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos ou; (2) antes da etapa de eluição do RNA da coluna e após a segunda lavagem com o tampão fornecido, a DNase I e seu respectivo tampão foram adicionados diretamente à coluna do kit, nas proporções indicadas pelo fabricante.

A coluna foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, adicionaram-se 600  $\mu\text{L}$  do tampão de lavagem. A coluna foi centrifugada por 1 minuto a 11.000  $g$  e prosseguiu-se à etapa de eluição, conforme recomendado pelo fabricante.

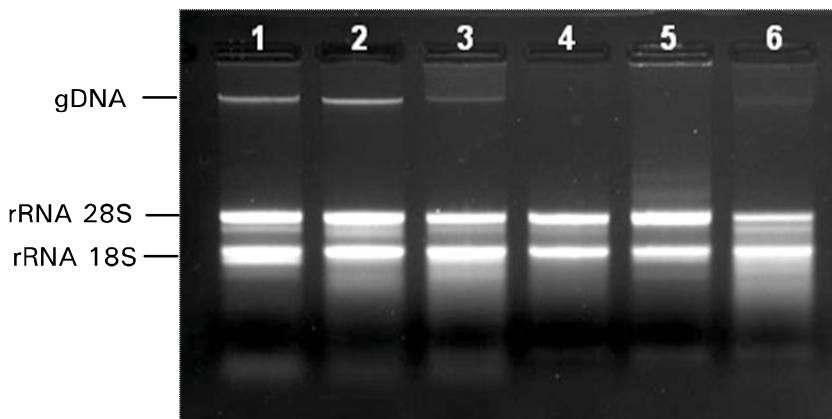
A integridade do RNA isolado foi conferida por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) não desnaturante e a estimativa de sua qualidade e concentração foi realizada pela medida de absorbância em um nanoespectrofotômetro.

Para a simulação da interferência de contaminantes no resultado das medidas de qualidade do RNA, amostras de RNA total de folhas de *A. hypogaea* foram intencionalmente contaminadas com BSA (albumina do soro bovino) 0,005% (v/v), simulando uma contaminação com proteínas, e com reagentes frequentemente utilizados em protocolos de extração de RNA nas seguintes concentrações: etanol 1% (v/v); isopropanol 1% (v/v); clorofórmio 1% (v/v); Tris 1% (v/v); fenol 1% (v/v); tiocianato de guanidina 1% (v/v) e CTAB 0,5% (v/v). As concentrações das contaminações foram definidas como o valor mínimo possível que garantisse precisão nas pipetagens. Para cada amostra contaminada foi realizada, também, a análise da respectiva amostra controle, não contaminada, com a mesma concentração de RNA. O volume de 1,5  $\mu\text{L}$  de cada preparação foi utilizado para a leitura no nanoespectrofotômetro seguindo-se as orientações do fabricante. As leituras foram realizadas em triplicatas. Variações nos valores das razões entre as medidas a 260 nm e 280 nm (260/280) e 260 nm e 230 nm (260/230) de até dois pontos (valor medido  $\pm$  2) foram interpretadas como decorrentes da técnica e não foram consideradas como variações reais por causa do tratamento.

## Resultados e Discussão

O protocolo descrito neste trabalho para a extração de RNA total de espécies de *Arachis* apresentou boa eficiência para as três espécies testadas com rendimento médio de 30 ng de RNA total por mg de material macerado, íntegro, com as bandas referentes aos RNAs

ribossomais (rRNA) 28S e 18S bem definidas em gel de agarose, não apresentando sinais de degradação (Figura 1). Observou-se que a precipitação do RNA em um volume final de etanol inferior ao proposto no protocolo original (WILKINS; SMART, 1996) não interferiu no resultado final da extração. Esta mudança também permitiu a utilização de tubos menores em sua capacidade volumétrica (de 2,0 mL ao invés de 15 mL) durante as precipitações, evitando-se eventual perda do precipitado e proporcionando economia de reagentes.



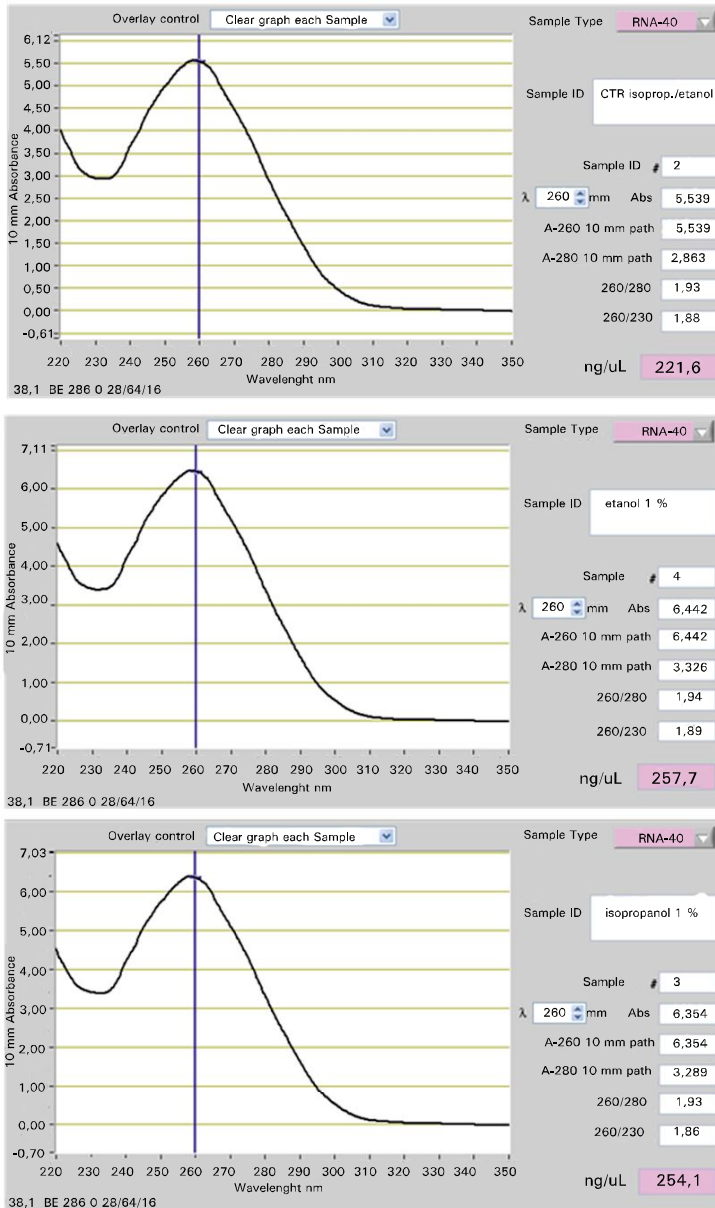
**Figura 1.** Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) sob condições não desnaturantes contendo amostras de RNA total sem tratamento com DNase e isoladas a partir de: 1) folhas de *Arachis duranensis*; 2) raízes de *A. duranensis*; 3) folhas de *Arachis hypogaea*; 4) raízes de *A. hypogaea*; 5) folhas de *Arachis stenosperma*; 6) raízes de *A. stenosperma*. As duas bandas presentes em destaque em todas as amostras referem-se às bandas de RNAs ribossomais (rRNA) 18S e 28S. Observa-se a presença de contaminantes de DNA genômico (gDNA).

A digestão do DNA presente nas amostras de RNA total por DNases foi realizada com sucesso após a purificação do RNA, utilizando-se uma unidade de enzima para cada 1  $\mu\text{g}$  de RNA. A eliminação do DNA após a purificação do RNA em coluna mostrou-se mais eficiente do que sua eliminação por aplicação da DNase diretamente na resina do kit, conforme sugerido pelo fabricante (dados não mostrados). O RNA extraído das três espécies pela metodologia otimizada neste estudo apresentou qualidade suficiente para ser utilizado em reações de transcrição reversa, PCR e qPCR, conforme descrito por Morgante et al. (2011).



Com o objetivo de avaliar as principais dificuldades enfrentadas na obtenção e interpretação de medidas de qualidade e quantidade do RNA total por espectrofotometria, foram adicionados às amostras de RNA total de folha de *A. hypogaea* reagentes para simular o resultado de contaminações comumente encontradas em protocolos de extração de ácidos nucleicos.

Neste estudo, a adição dos álcoois etílico e isopropílico à amostra de RNA não provocou alteração do padrão da curva de absorção, porém, essa contaminação intencional fez com que as leituras a 260 nm e 280 nm ficassem levemente superestimadas, com um aumento de aproximadamente 15% em relação à amostra controle. No entanto, esse incremento não afetou os valores das razões A260/A280 e A260/A230 (Figura 2), utilizadas para estimar a qualidade do ácido nucleico. De forma similar, os resultados apresentados por Wieczorek et al. (2012) indicaram que a contaminação de amostras de RNA com etanol e isopropanol, ambos em uma concentração de 5%, cinco vezes superior àquela utilizada neste estudo, não alterou as relações de absorbância A260/A280 e A260/A230, em relação à amostra não contaminada. Os álcoois etílico e isopropílico são comumente utilizados em protocolos de extração, juntamente com um sal, para a precipitação de ácidos nucleicos. O primeiro é também usado nos protocolos de extração de RNA na concentração de 70-75% na etapa de lavagem, para a remoção do excesso de sais. No entanto, a permanência de resíduos desses álcoois na amostra de RNA ao final do processo de extração é indesejada, pois pode prejudicar sua solubilidade no tampão ou em água.

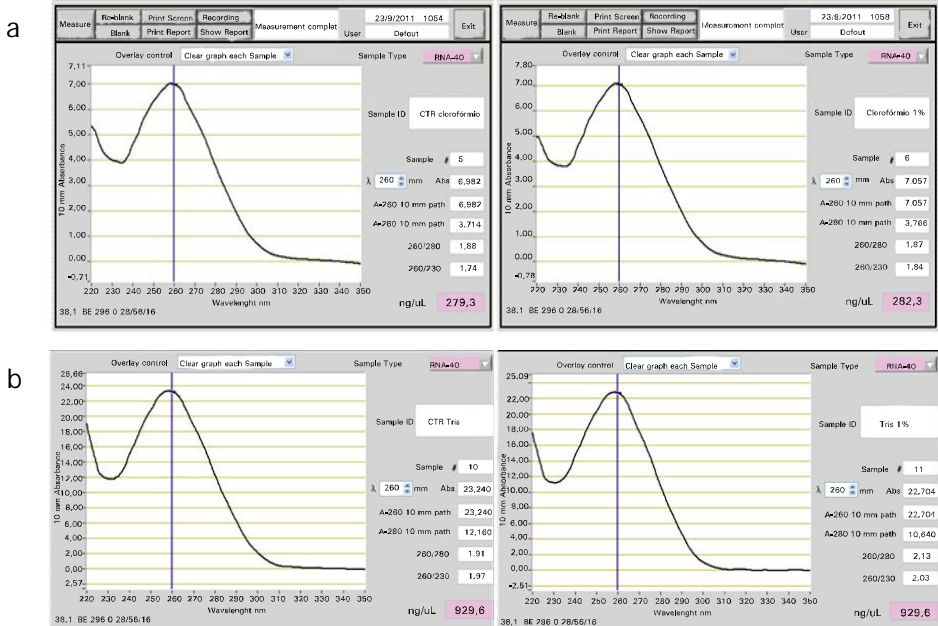


**Figura 2.** Curvas de absorção a luz UV obtidas nas análises de espectrometria realizadas em nanoespectrofotômetro. a) Amostra controle de RNA total; b) amostra de RNA total contaminada com 1% de álcool etílico (v/v); c) amostra de RNA total contaminada com 1% de álcool isopropílico (v/v).

Em paralelo, a contaminação da amostra de RNA com outro solvente apolar, o clorofórmio, utilizado em protocolos de extração de ácidos nucleicos para a desnaturação de proteínas, não alterou o padrão da curva de absorção e os valores de absorbância a 260 nm e 280 nm (Figura 3a).

Os resultados apresentados indicam que na avaliação da qualidade do RNA por espectrofotometria não foi capaz de indicar contaminações importantes por álcoois e clorofórmio nas amostras de RNA. Dados da literatura demonstram resultados similares para medidas de contaminação por etanol e isopropanol em amostras de RNA humano, observando-se que medidas realizadas com RNA diluído em TE apresentaram maiores índices de pureza, em relação àqueles diluídos em água (BIOMEDICAL CENTER, 2007).

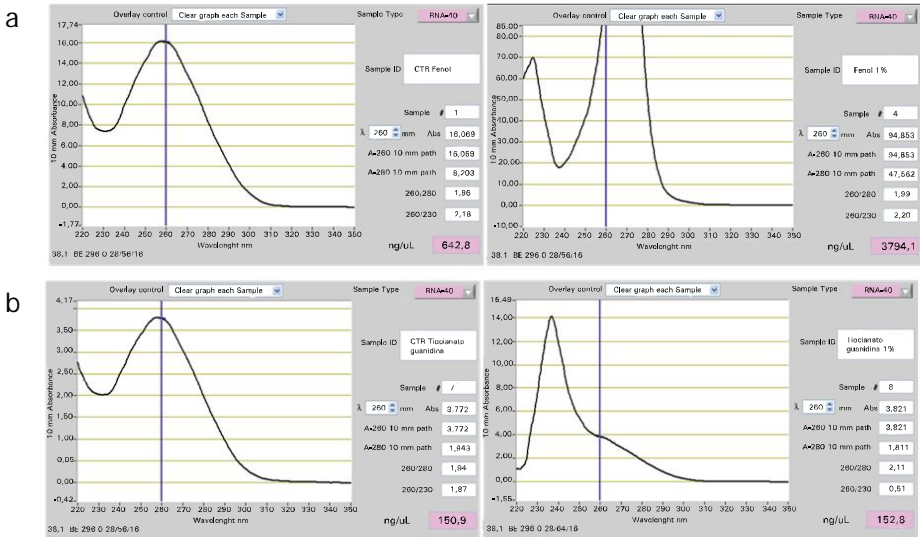
A presença de Tris nas amostras de RNA não alterou o padrão da curva de absorção e os valores de leitura a 260 nm e 280 nm (Figura 3b) e a presença desse reagente parece não interferir na quantificação do RNA por espectrofotometria. O uso desse tampão em pH alcalino é, inclusive, frequentemente indicado para esse fim, pois, além de manter a integridade de ácidos nucleicos, aumenta o poder de detecção de agentes contaminantes na análise por espectrofotometria (WILFINGER et al., 1997).



**Figura 3.** Curvas de absorção a luz UV obtidas nas análises de espectrofotometria realizadas em nanoespectrofotômetro. a) medida da amostra de RNA total contaminada com clorofórmio 1% (v/v) (direita) e seu respectivo controle (esquerda); b) medida da amostra de RNA total contaminada com Tris 1% (p/v) (direita) e seu respectivo controle (esquerda).

A contaminação por fenóis em amostras de ácidos nucleicos pode ser originada do material biológico, ou como resíduo do próprio reagente utilizado durante a extração. A contaminação intencional de fenol 1% na amostra de RNA total causou uma mudança no perfil da curva de absorção, ocorrendo um novo pico de absorção na faixa de 220-230 nm, uma vez que compostos fenólicos absorvem luz em comprimento de onda próximo a 230 nm (NANODROP, 2007). Além disso, foi observado um deslocamento do pico principal de 260 nm para 270 nm e um aumento na absorbância a 260 nm e 280 nm, causando uma superestimativa na quantificação do RNA total, superior a 5 vezes em relação ao valor da amostra controle (Figura 4a). Dados da literatura indicam que a contaminação de RNA humano com fenol 0,01% não causa alterações nos valores de absorbância nos comprimentos de onda de 230 nm, 260

nm e 280 nm e anormalidades na curva de absorção foram detectadas a partir da concentração de fenol 0,1% (BIOMEDICAL CENTER, 2007). Held (2001) demonstrou que a contaminação de uma amostra de DNA com 1% da mistura fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) causou uma redução da razão das absorbâncias A260/A280 e A240/A280, indicando a absorção de luz dessa mistura de reagentes na faixa entre 240 nm e 260 nm.



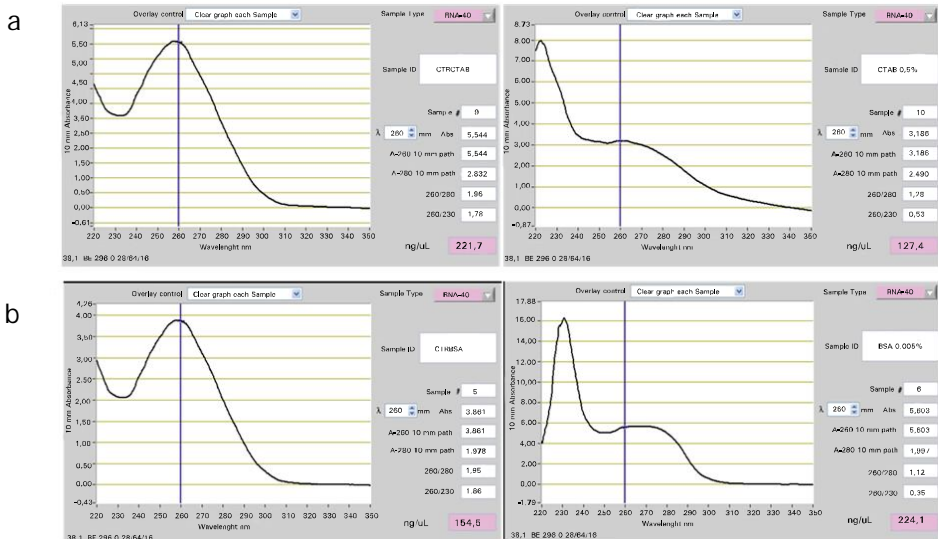
**Figura 4.** Curvas de absorção a luz UV obtidas nas análises de espectrofotometria realizadas. a) Medida da amostra contaminada com fenol 1% (v/v) (direita) e seu respectivo controle (esquerda); b) medida da amostra contaminada com tiocianato de guanidina 1% (v/v) (direita) e seu respectivo controle (esquerda).

A contaminação de RNA humano com fenol também gerou um segundo pico na curva de absorção, próximo aos comprimentos de onda de 220-230 nm, um deslocamento do pico principal para a faixa de 270 nm e um aumento do valor de quantificação do RNA (BIOMEDICAL CENTER, 2007). Diante desses resultados, alerta-se para as consequências negativas que o uso de protocolos baseados em fenol pode causar, caso seus resíduos não sejam eliminados totalmente, levando à superestimação da quantidade final de RNA, um problema, quando o objetivo é a análise da expressão gênica.

Já a contaminação com tiocianato de guanidina, reagente comum em protocolos de isolamento de RNA, deslocou o pico de absorção para a faixa de 230 nm, porém, não alterou o valor das leituras a 260 nm e 280 nm e, portanto, não afetou a quantificação de RNA (Figura 4b). Apesar de não ter ocorrido uma grande alteração no valor da relação A260/A280, a baixa qualidade do RNA pode ser acessada pela relação A260/A230, que alterou de 1,87 na amostra controle para 0,51 na amostra contaminada por tiocianato de guanidina. As alterações observadas podem ser explicadas pelo fato de a guanidina absorver luz a um comprimento de onda próximo a 230 nm, razão da origem de um segundo pico na curva de absorção gerada pelo nanoespectrofotômetro (NANODROP, 2007). Resultados similares foram obtidos na contaminação de RNA humano com isocianato de guanidina nas concentrações de 0,1% e 0,5%, em que o resultado da quantificação, dado pela medida a 260 nm e o valor da relação A260/A280 não foram alterados, porém, a relação A260/A230 foi reduzida drasticamente, indicando a má qualidade do RNA e sua inviabilidade para aplicações envolvendo reações enzimáticas (BIOMEDICAL CENTER, 2007). Em conformidade com esses resultados, Wieczorek et al. (2012) também demonstraram que a contaminação de uma amostra de RNA com 0,01% de um tampão contendo tiocianato de guanidina não alterou o valor da razão A260/A280, porém, provocou uma redução do valor da relação A260/A230. Os dados levam a concluir que mesmo quantidades pequenas de guanidina como contaminantes em amostras de RNA total podem ser detectadas por espectrofotometria, mais especificamente, por meio da razão A260/A230.

A contaminação com CTAB, outro reagente comumente presente no tampão de homogeneização de protocolos de isolamento de ácidos nucleicos, também causou um deslocamento do pico de absorção para a faixa de 220-230 nm. No entanto, não houve alteração no valor da absorbância a 280 nm, ao contrário do valor a 260 nm, que reduziu de 5,54 na amostra controle para 3,19 na amostra contaminada e a quantidade de RNA foi subestimada (Figura 5a). Nesse caso, a baixa qualidade do RNA pode ser avaliada pelas relações A260/A280 e A260/A230, que apresentaram valores abaixo do esperado para uma amostra de boa qualidade. Além de absorver luz próximo ao comprimento de onda

de 230 nm, o CTAB é capaz de se ligar a ácidos nucleicos por meio de interações eletrostáticas, formando complexos hidrofóbicos (WANG et al., 2000), o que pode explicar a redução do valor de absorvância a 260 nm observado.



**Figura 5.** Curvas de absorção a luz UV obtidas por análises de espectrometria realizadas em nanoespectrofotômetro. a) Medida da amostra contaminada com CTAB 0,5% (p/v) (direita) e seu respectivo controle (esquerda); b) medida da amostra contaminada com BSA 0,005% (p/v) (direita) e seu respectivo controle (esquerda).

A adição de BSA 0,005 % à amostra de RNA foi utilizada para simular uma contaminação por proteínas, normalmente originada pela lise celular. Como resultado, um novo pico de absorção a 230 nm foi visualizado e houve um incremento na leitura a 280 nm, que variou de 1,94, na amostra não contaminada, para 4,99 na amostra contaminada (Figura 5b). A leitura a 280 nm é comumente realizada para estimar o grau de pureza da amostra de ácido nucleico, sobretudo para identificar contaminações por proteínas, uma vez que aquelas que contêm os aminoácidos triptofano, tirosina, fenilalanina ou resíduos de cisteína com ligações dissulfeto absorvem luz UV e apresentam máxima absorvância a 280 nm (NELSON; COX, 2000). Proteínas também absorvem luz na faixa de 230 nm e a leitura nesse comprimento de onda pode ser usada para sua quantificação e determinação de sua estabilidade termodinâmica e cinética de dobramento (LIU et al., 2009; WHITAKER; GRANUM., 1980).

## Conclusões

O protocolo descrito para o isolamento de RNA total a partir de folhas e raízes de *Arachis* spp. mostrou-se eficiente e com bom rendimento para as três espécies testadas, com potencial para ser adaptado para outras espécies vegetais ricas em compostos fenólicos e polissacarídeos.

Os resultados obtidos pela avaliação do efeito de contaminações na quantificação de amostras de RNA total, realizada por espectrofotometria, demonstraram que os reagentes fenol, tiocianato de guanidina, CTAB e BSA provocaram modificações expressivas no padrão da curva de absorção sob luz UV, em relação às amostras controle. A contaminação com etanol, isopropanol, clorofórmio e Tris não provocou grandes efeitos na quantificação e na análise da qualidade do RNA. Esses resultados poderão ser utilizados como um protocolo referência de forma a complementar a quantificação de amostras de RNA total pelo método de espectrofotometria para a detecção da presença de contaminantes.

## Referências

ALMARZA, J.; MORALES, S.; RINCON, L.; BRITO, F. Urea as the only inactivator of RNase for extraction of total RNA from plant and animal tissues. **Analytical Biochemistry**, Oxford, v. 358, n. 1, p. 143-145, 2006.

BILGIN, D. D.; DELUCIA, E. H.; CLOUGH, S. J. A robust plant RNA isolation method suitable for Affymetrix GeneChip analysis and quantitative real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, [Hampshire], v. 4, p. 333-340, 2009.

BIOMEDICAL CENTER. **RNA quality control**. 2007. Disponível em: < [http://biomedicalgenomics.org/RNA\\_quality\\_control.html](http://biomedicalgenomics.org/RNA_quality_control.html)>. Acesso em: 30 nov. 2013.

BARBAS III, C. F.; BURTON, D. R.; SCOTT, J. K.; SILVERMAN, G. J. Quantitation of DNA and RNA. **Cold Spring Harbor Protocols**, Bethesda, v. 1, n. 11, 2007. Disponível em: < <http://Cshprotocols.cshlp.org/content/2007/11/pdb.ip47.full>>. Acesso em: 28 out. 2014.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 11, p. 113-116, 1993.



CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction: twenty-something years on. **Nature Protocols**, [Hampshire], v. 1, n. 2, p. 581-585, 2006.

FAO. **FAOSTATF**. Rome, 2013. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org> > . Acesso em: 15 jan. 2015.

GHAWANA, S.; PAUL, A.; KUMAR, H.; KUMAR, A.; SINGH, H.; BHARDWAJ, P. K.; RANI, A.; SINGH, R. S.; RAIZADA, J.; SINGH, K.; KUMAR, S. An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. **BMC Research Notes**, London, v. 4, n. 85, 2011. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21443767> > . Acesso em: 14 set. 2014.

HELD, P. **The importance of the 240 nm absorbance measurement**. 2009. Disponível em: < <http://www.biotek.com/resources/articles/240-nm-absorbance-measurement.html> > . Acesso em: 28 out 2014.

LIU, P. F.; AVRAMOVA, L. V.; PARK, C. Revisiting absorbance at 230 nm as a protein unfolding probe. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 389, p. 165-170, 2009.

LUKENS, L.; ZHAN, S. Plant bioinformatics and microarray technologies. **Comprehensive Biotechnology**, [Oxford], v. 4, p. 149-163, 2011.

MORGANTE, C. V.; MARTINS, A. C. Q.; ARAUJO, A. C. G. de; LEAL-BERTIOLI, S. C. de M.; BERTIOLI, D. J.; GUIMARAES, P. M.; BRASILEIRO, A. C. M. **Seleção de genes de referência para estudos de expressão gênica no gênero *Arachis***. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2009. 27 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 249).

MORGANTE, C. V.; GUIMARÃES, P. M.; MARTINS, A. C. Q.; ARAUJO, A. C. G.; LEAL-BERTIOLI, S. C.; BERTIOLI, D. J.; BRASILEIRO, A. C. M. Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. **BMC Research Notes**, London, v. 4, p. 1-11, 2011.

NELSON, D.; COX, M. M. Amino acid, peptides, and proteins. In: \_\_\_\_\_. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd. New York: Worth Publishers, 2000. cap. 5, p. 115-158.

PANDEY, M. K.; MONYO, E.; OZIAS-AKINS, P.; LIANG, X.; GUIMARÃES, P.; NIGAM, S. N.; UPADHYAYA, H. D.; JANILA, P.; ZHANG, X.; GUO, B.; COOK, D. R.; BERTIOLI, D. J.; MICHELMORE, R.; VARSHNEY, R. K. Advances in *Arachis* genomics for peanut improvement. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 30, p. 639-651, 2012.

RIO, D. C.; ARES.; M.; HANNON, G. J.; NILSEN, T. W. Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. **Cold Spring Harbor Protocols**, Bethesda, n. 6, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516176> > . Acesso em: 18 set 2014.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reports**, Heidelberg, v. 17, p. 11-17, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SMART, M.; RODEN, L. C. A small-scale RNA isolation protocol useful for high-throughput extractions from recalcitrant plants. **South African Journal of Botany**, Scottsville, v. 76, p. 375-379, 2010.

SUZUKI, Y.; MAE, T.; MAKINO, A. RNA extraction from various recalcitrant plant tissues with a cethyltrimethylammonium bromide-containing buffer followed by an acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform treatment. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 72, p. 1.951-1.953, 2008.

TAKAHASHI, T.; IRIE, M.; UKITA, T. A comparative study on enzymatic activity of bovine pancreatic ribonuclease A, ribonuclease S and ribonuclease S. **Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 55-62, 1969.

THERMO SCIENTIFIC. **Working with RNA: the basics** technical note. Washington, D. C., 2012. Disponível em: < <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/working-with-rna-the-basics.html> > . Acesso em: 30 dez. 2014.

VIJAY, N.; POELSTRA, J. W.; KÜNSTNER, A.; WOLF, J. B. W. Challenges and strategies in transcriptome assembly and differential gene expression quantification. A comprehensive *in silico* assessment of RNA-seq experiments. **Molecular Ecology**, Hoboken, v. 22, n. 3, p. 620-634, 2013.

WANG, Z.; LIU, D.; DONG, S. Voltammetric and spectroscopic studies on methyl green and cationic lipid bound to calf thymus DNA. **Biophysical Chemistry**, Oxford, v. 87, p. 179-184, 2000.

WANG, X.; TIAN, W.; LI, Y. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. **Molecular Biotechnology**, Chan, v. 38, p. 1.424-1.428, 2008.

WHITAKER, J. R.; GRANUM, P. E. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. **Analytical Biochemistry**, Oxford, v. 109, p. 156-159, 1980.

WIECZOREK, D.; DELAURIERE, L.; SCHAGAT, T. **Methods of RNA quality assessment**. [Madison]: Promega, 2012. Disponível em: < <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/methods-of-rna-quality-assessment/> > . Acesso em: 28 out. 2014.

WILFINGER, W. W.; MACKEY, K.; CHOMCZYNSKI, P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **BioTechniques**, Chan, v. 22, p. 474-481, 1997.

WILKINS, T. A.; SMART, L. B. Isolation of RNA from plant tissue. In: KRIEG, P. A. (Ed.). **A laboratory guide to RNA: isolation, analysis, and synthesis**. New York: Wiley-Liss Inc., 1996. p. 21-41.

WINK, M. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. **Theoretical and Applied Genetics**, Chan, v. 75, n. 2, p. 225-233, 1988.

YIN, D.; LIU, H.; ZHANG, X.; CUI, D. A protocol for extraction of high-quality RNA and DNA from peanut plant tissues. **Molecular Biotechnology**, Heidelberg, v. 49, p. 187-191, 2011.



Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**



CGPE 12542