



Aprimoramento de protocolos de extração de DNA de sangue armazenado em cartões FTA

Naiara Milagres Augusto da Silva¹, Ronyere Olegário de Araújo², Thaisa Sant'Anna Lacerda³, Cláudia Cristina Gúlias Gomes⁴, Fernando Flores Cardoso⁵, Samuel Rezende Paiva⁶, Alexandre Rodrigues Caetano⁷

¹ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Brasília. e-mail: nmilagres@cenargen.embrapa.br

² Programa de Pós Graduação em Ciências Animais, Universidade de Brasília/Brasília. email: ronyereo@yahoo.com.br

³ Programa de Pós Graduação em Ciências Animais, Universidade de Brasília/Brasília. email: lacerdathaisa@gmail.com

⁴ Embrapa Pecuária Sul/Bagé. e-mail: claudia@cppsul.embrapa.br

⁵ Embrapa Pecuária Sul/Bagé. e-mail: fcardoso@cppsul.embrapa.br

⁶ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Brasília. e-mail: samuel@cenargen.embrapa.br

⁷ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Brasília. e-mail: acaetano@cenargen.embrapa.br

Resumo: Entre as técnicas para extração de DNA, se destaca, pela sua praticidade, a extração de amostras de sangue conservadas em cartões FTA. Este trabalho teve como objetivo o aprimoramento de protocolos para extração de DNA de amostras de sangue armazenadas em cartões FTA para uso em estudos genômicos. As amostras foram extraídas usando dois protocolos, e parte destas amostras foram genotipadas usando chip comercial (BovineSNP50, Illumina). As concentrações médias de DNA recuperado com os protocolos testados apresentaram diferença significativa na ANOVA, com nível de significância de 0,02. Pelo teste de Tukey, houve diferença estatística significativa entre as médias das concentrações de DNA total e entre as razões 260/280, o que indicou que o protocolo 2 foi mais eficiente, gerando amostras com maior quantidade de DNA e com menos impurezas. Os protocolos se mostraram adequados para a extração de amostras de sangue conservadas em cartões FTA e as modificações no protocolo aumentaram a quantidade e a qualidade de DNA recuperado, e permitiram reduções de custo significativas.

Palavras-chave: extração de DNA, FTA, genotipagem em massa de SNPs

Improvement of protocols for DNA extraction from blood samples stored on FTA cards

Abstract: Considering the available techniques for DNA extraction, the use of blood samples stored on FTA cards stands out for its practicality. This work aimed to improve protocols for DNA extraction from blood samples stored on FTA cards for use in genomic studies. Samples were extracted using two protocols and part of the samples was genotyped using a commercial SNP chip (BovineSNP50, Illumina). Mean concentrations of recovered DNA were statistically different in ANOVA, with a significance level of 0.02. Observed differences between concentration means of total DNA and 260/280 ratio indicated that the second protocol tested was more efficient, resulting in samples with more DNA and with less contaminants. Both protocols were appropriate for the extraction of blood samples stored on FTA cards and the changes introduced in the protocol improved the amount of recovered DNA and the quality of the extracted genetic material, while allowing significant cost reductions.

Keywords: DNA extraction, FTA, SNP genotyping

Introdução

Existem várias técnicas padronizadas para extração de DNA baseadas em diferentes metodologias que podem ser utilizadas para processar diferentes amostras biológicas de origem animal. Entre elas se destaca, pela sua praticidade, a extração de amostras de sangue conservadas em cartões FTA. O cartão FTA é um papel impregnado por reagentes que causam lise celular, desnaturam proteínas e protegem os ácidos nucleicos de danos causados por nucleases, oxidação e raios UV. As vantagens do uso de cartões FTA para coleta e conservação de amostras de sangue incluem facilidade de coleta, estocagem em temperatura ambiente por longos períodos, inibição do crescimento de patógenos, facilidade de envio de amostras entre laboratórios e facilidade de extração do DNA (WHATMAN, 2010). Este trabalho teve como objetivo o aprimoramento de protocolos para extração de DNA de amostras de sangue armazenadas em cartões FTA para uso em estudos de genotipagem de marcadores SNP com chips de alta densidade.

Material e Métodos

Foram extraídas 2.161 amostras de sangue coletadas em cartões FTA de animais das raças Hereford e Braford de rebanhos criados no Rio Grande do Sul, avaliados pelo programa de melhoramento genético Conexão Delta G. As amostras foram processadas utilizando um protocolo modificado (Protocolo 1), que consistiu na



lavagem de 2 círculos de 6mm de cada amostra com reagente de purificação MGM[®], seguida de liberação do DNA do papel FTA com kit GenSolve (GenVault[®]), purificação com fenol/clorofórmio e precipitação do DNA em etanol. A principal modificação introduzida foi a redução do volume das soluções em 50% do protocolo padrão. Um subconjunto de 50 amostras extraídas com o protocolo 1 foi tratado também com um segundo protocolo (Protocolo 2), contendo modificações para melhorar a quantidade e o rendimento do DNA extraído. Para isto, a etapa de lavagem dos círculos de papel FTA impregnado com sangue foi feita com uma solução SDS 0,5% em tampão TE, com incubação *overnight* a 40°C e agitação de 400 rpm, sendo que o restante do procedimento de extração seguiu as mesmas etapas do Protocolo 1.

Todas as amostras de DNA foram quantificadas com um espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000). Análises estatísticas comparando o rendimento (ng) e a qualidade do DNA extraído (razão de absorvância 260/280) com os dois protocolos foram realizadas com o pacote estatístico SAS (SAS, 2003).

As amostras extraídas utilizando-se o Protocolo 1 foram genotipadas com chips comerciais BovineSNP50 (Illumina Inc., San Diego, CA), contendo um total de 54.609 polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) para a realização de estudos de associação e seleção genômica. O % de marcadores genotipados em cada uma das amostras (*call rate*) foi correlacionado com os dados de quantificação e de qualidade do DNA utilizando o SAS.

Resultados e Discussão

A média da concentração de DNA extraído e a média da razão 260/280, para cada um dos protocolos, assim como os respectivos desvios padrão e CV estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação dos protocolos de extração de DNA de sangue em cartões FTA

	DNA Total			Razão 260/280		
	Média (ng) *	Desvio padrão	CV (%)	Média **	Desvio padrão	CV (%)
Protocolo 1	1793,45 ^B	1018,95	56,82	1,72 ^B	0,11	6,39
Protocolo 2	2359,01 ^A	1482,76	62,85	1,84 ^A	0,13	7,23

Letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferença estatística entre as médias. CV= coeficiente de variação. *P<0,05. **P<0,01.

As concentrações médias de DNA recuperado apresentaram diferença significativa na ANOVA, com nível de significância de 0,02. Pelo teste de Tukey, houve diferença estatística significativa entre as médias das concentrações de DNA total e entre as razões 260/280, o que indicou que o Protocolo 2 foi mais eficiente, gerando amostras com maior quantidade de DNA e com menos impurezas.

Os resultados encontrados se assemelham àqueles apresentados por HALBERT *et al.* (2009) em que foram extraídas 8 amostras de sangue de cartões FTA utilizando kit GenSolve conforme as recomendações do fabricante, com recuperação de DNA de 257 a 2525ng para cada 2 círculos de 6mm, com razão 260/280 variando entre 1,39 e 1,87. Este resultado indica que os protocolos testados no presente trabalho são adequados para a extração de amostras de sangue conservadas em cartões FTA e que as modificações do Protocolo 2 aumentaram a quantidade de DNA recuperado, além de melhorar a qualidade do material genético extraído e reduzir os custos de processamento de amostras.

Com base no resultado da genotipagem, as amostras foram divididas em dois grupos, A e B, em função do valor do *call rate*, sendo que o grupo A foi formado por amostras com *call rate* acima de 98% e o grupo B por amostras com *call rate* abaixo de 98%. Para cada um dos grupos foram calculados o *call rate* médio, a quantidade média de DNA extraída, os respectivos CV e a correlação entre o valor de *call rate* e a quantificação de DNA no Nanodrop. Estes resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Correlação entre os valores de *call rate* e a quantificação de DNA no Nanodrop

	Call rate		Quantidade de DNA		Correlação
	Média (%)	CV (%)	Média (ng)	CV (%)	
Grupo A	99,14	0,34	1826,5	62,83	0,199*
Grupo B	94,31	5,42	1407,5	65,52	-0,302**

CV= coeficiente de variação. *P<0,001 **P<0,02

Os resultados de correlação entre os valores de *call rate* e a quantificação de DNA no Nanodrop indicam que, para as amostras com *call rate* alto (>98%), o aumento na quantidade de DNA foi acompanhado pelo aumento no valor de *call rate*, enquanto que, entre as amostras com *call rate* baixo (<98%), o aumento na quantidade de DNA levou a um menor *call rate*.



**Anais da 49ª Reunião Anual da
Sociedade Brasileira de Zootecnia
A produção animal no mundo em transformação**

Brasília – DF, 23 a 26 de Julho de 2012



A realização de testes de genotipagem com as amostras extraídas pelo Protocolo 2 poderia confirmar as melhorias na quantidade e na qualidade de DNA extraído, pela comparação destes parâmetros com os valores de *call rate* que seriam gerados, como forma de verificar a manutenção da qualidade da genotipagem de amostras extraídas com o protocolo alternativo.

Conclusões

Os protocolos se mostraram adequados para a extração de amostras de sangue conservadas em cartões FTA e as modificações no protocolo aumentaram a quantidade de DNA recuperado, melhoraram a qualidade do material genético extraído e permitiram reduções no custo de processamento das amostras da ordem de 50%.

Literatura citada

WHATMAN. **Whatman™ FTA™ for blood DNA**. Data file 51641. 2010.

HALBERT, N.; IVERSON, B.; DELL'ORCO, R.; COHEN, L. **Recovery of DNA from a filter paper matrix for high-throughput genotyping**. GenVault Corporation, Carlsbad, California. 2009.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system: user's guide**. Version 9.1. Cary, USA, 2003.