

Limpendo DNA com detergente

Anderson Felipe dos Santos Cordeiro*, Milena Cristina Moraes, Mônica Rosa Bertão,

Priscila Ventura Loose, Darío Abel Palmieri

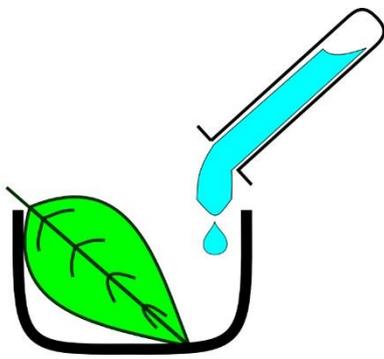
Departamento de Ciências Biológicas. Faculdade de Ciências e Letras. Univ Estadual Paulista. UNESP- Câmpus de Assis. Avenida Dom Antonio, 2100, Parque Universitário - 19806-900 - Assis-SP. *adrs.x@hotmail.com

Palavras-chave: extração de DNA, marolo, teste de reagente

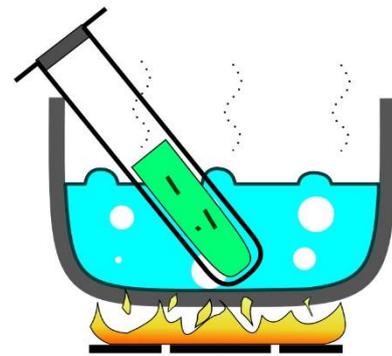
Estudos do DNA, dentre muitas outras importâncias, oferecem informações que podem ser utilizadas comercialmente e/ou para conservação ecológica. Uma das técnicas que auxiliam esses estudos é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que multiplica um ou mais pedaços do DNA. É como cortar um texto de um livro e depois replicá-lo utilizando uma copiadora eletrônica, ao invés de comprar vários livros e recortar um texto de cada um.

O DNA, antes de ser utilizado em PCR, deve ser retirado da célula e purificado em um procedimento chamado de extração. Um método de extração de DNA de plantas foi desenvolvido pelos pesquisadores Jeff J. Doyle e Jane L. Doyle em 1987. Neste, pequenas porções de folhas são amassadas e misturadas em um tampão de extração, composto por água, detergente, sal e alguns reagentes de purificação, antioxidantes e mantedores de pH. A mistura passa por etapas de banho-maria, **centrifugação** e **homogeneização** em outros reagentes para que, no final do processo, fique somente o DNA (Figura 1).

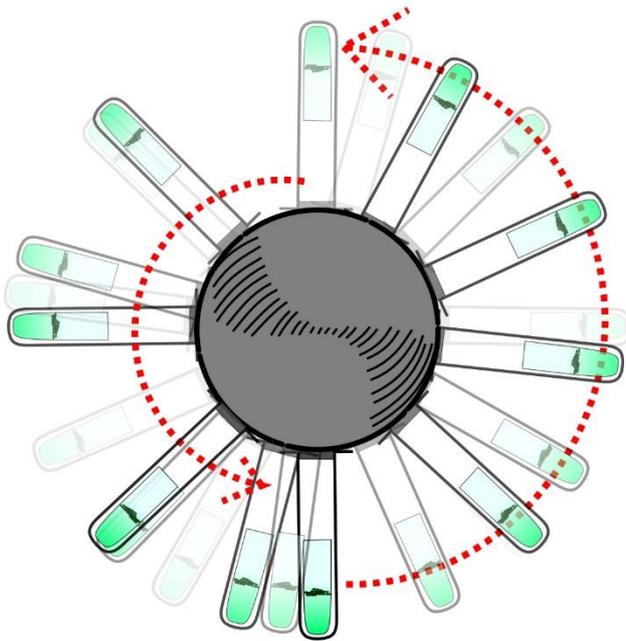
Há duas formas de saber se o DNA obtido na extração está purificado e/ou em quantidade suficiente para ser estudado posteriormente: eletroforese em gel de agarose e espectrofotometria. Na primeira, o pesquisador prepara um gel (parecido com uma gelatina caseira) que possui pequenos buracos, nos quais é posto um pouco do DNA extraído com um corante que, sob luz ultravioleta, emite um brilho vermelho-alaranjado que fica 20 vezes mais forte na presença de DNA.



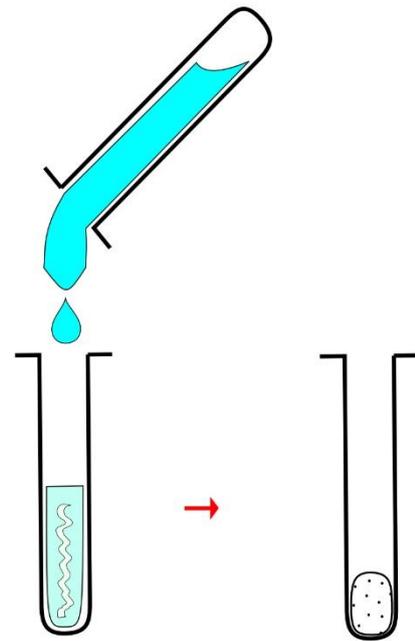
1- A folha é amassada e misturada no tampão de extração, que **lisa** as células e libera o DNA. A mistura é colocada em um tubo.



2- Banho-maria. A temperatura elevada acelera a ação dos reagentes.

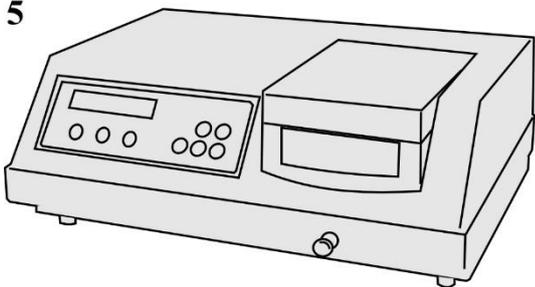


3- **Centrifugação**. Após o processo as impurezas ficam no fundo do tubo e o DNA diluído no **sobrenadante**, que é transferido para outro tubo.



4- É adicionado álcool e novamente a mistura é centrifugada...

5



...Dessa vez as impurezas ficam no **sobrenadante** (descartado) e o DNA fica compactado em uma pequena massa branca, que depois é diluída. A amostra pode ser quantificada no espectrofotômetro (5) e qualificada na eletroforese em gel de agarose (6).

6

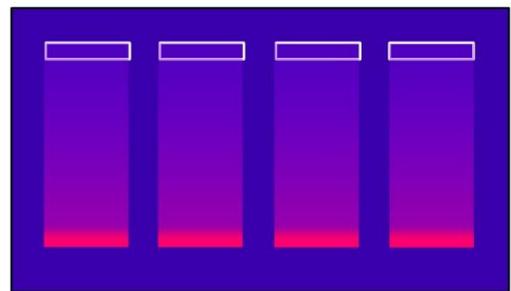


Figura 1. Simplificação do processo de extração de DNA em plantas.

No gel podemos ver ainda se o DNA está fragmentado e se há impurezas. Enquanto a eletroforese é uma avaliação visual, a espectrometria gera valores numéricos.

Pesquisadores do Laboratório de Biotecnologia Vegetal, da UNESP de Assis, São Paulo, procuraram realizar PCRs com o DNA do marolo (*Annona crassiflora*). O marolo é uma das árvores mais abundantes do Cerrado, portanto, estudar sua biologia auxilia na compreensão e conservação deste ambiente. O marolo produz um fruto que lembra a fruta do conde, só que é maior (Figura 2). As pessoas o comem *in natura*, fazem doces, sorvetes, licores, bolos, etc. Além disso, suas folhas e raízes são utilizadas na medicina caseira para tratamentos intestinais e contra piolhos. Apesar do marolo apresentar 1.001 utilidades, o uso comercial em larga escala, e os estudos sobre ele são escassos.



Figura 2. Planta adulta de marolo (pode atingir 6 a 8m de altura) à esquerda e um de seus frutos à direita (o qual pode chegar a mais de 4 Kg).

Muitas espécies nativas do Cerrado produzem compostos que atrapalham a extração do DNA. Para estas, é preciso alterar algumas etapas e/ou a concentração de alguns reagentes do protocolo de extração (como modificar alguns ingredientes de uma receita de bolo), para que o DNA extraído tenha boa qualidade. Essa dificuldade também ocorreu com o marolo. Assim, os pesquisadores mudaram a concentração (proporção do líquido) do detergente (um dos reagentes do tampão de extração), e posteriormente verificaram a condição do DNA extraído através da

espectrofotometria e da eletroforese em gel de agarose. No protocolo de extração ele fica a 2% e os pesquisadores testaram o detergente a 0, 1, 2, 4 e 8%.

Os resultados da espectrofotometria podem ser visualizados na Figura 3. O grau de pureza foi inferior ao desejado sem o detergente e na concentração abaixo daquela proposta no protocolo por Doyle & Doyle. O DNA ficou mais puro e sua quantidade aumentou até a concentração de 4%. A de 8% foi prejudicial, pois tornou o tampão gelatinoso, dificultando o processo de extração. É como lavar louça: quanto mais detergente, mais limpo, porém, mais trabalho para enxaguar.

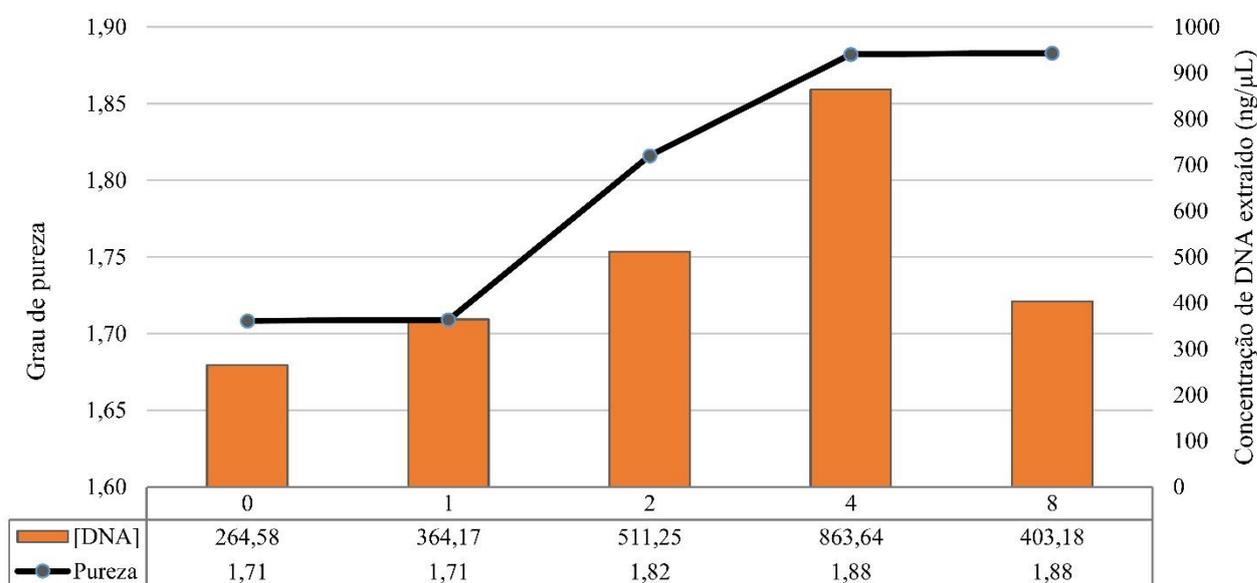


Figura 3. Resultados da espectrofotometria dos tratamentos com detergente a 0, 1, 2, 4 e 8%. A linha, que segue o eixo da esquerda, representa o quanto o DNA está limpo: um grau de pureza bom para PCR fica entre 1,8 e 2,0. As barras, que seguem o eixo da direita, são as quantidades de DNA extraído: acima de 100 nanogramas (ng)/microlitro (μL) já é o suficiente para realizar várias PCRs.

No gel de agarose todas as amostras brilharam quando expostas à luz ultravioleta, confirmando a existência de DNA extraído (Figura 4). Entretanto, as bandas das amostras

deveriam ficar mais finas, mas apresentaram-se bem largas, indicando que há ainda algum contaminante que não foi removido.

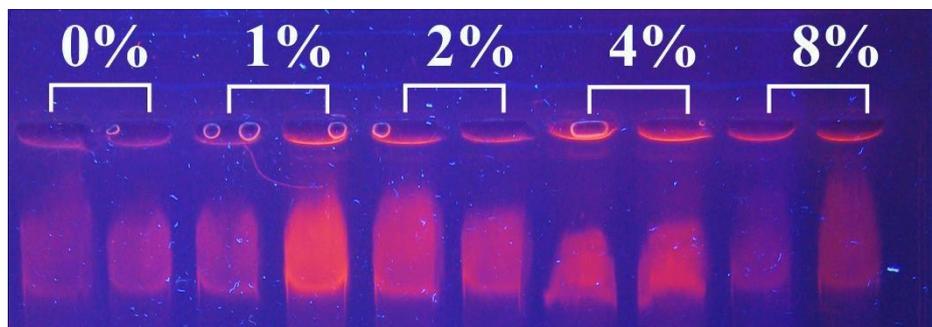


Figura 4. Resultados da eletroforese em gel de agarose dos tratamentos com detergente em diferentes concentrações.

Ficou claro que o tratamento com detergente a 4% foi o que apresentou os melhores resultados, se comparado aos demais tratamentos, pois foi o que mais extraiu DNA com grau de pureza aceitável. Entretanto, o resultado mais impactante do aumento do detergente foi outro: no protocolo base, o DNA extraído apresentou-se como uma substância viscosa que atrapalhava toda a quantificação e qualificação. O detergente a 4% removeu boa parte dessa viscosidade, e a 8% ela era praticamente inexistente.

Enfim, descanso...?

O resultado do detergente é promissor, mas o trabalho dos biólogos ainda está longe de ser concluído. O contaminante que deixa as bandas mais largas no gel precisa ser retirado. Ainda é preciso também testar os outros reagentes e determinar um protocolo de extração eficiente para o marolo. Com o protocolo pronto, os pesquisadores terão ainda que coletar folhas de muitos marolos de lugares diferentes (isso significa andar muito por fazendas e bosques, tomar sol e picadas de mosquitos), extrair o DNA de cada um (cada extração dura pelo menos 2 dias), para depois desenvolver a reação de PCR. Esta última demanda tempo e disposição dos pesquisadores, mas

adiciona discussões importantes para a compreensão da biologia do marolo e, em consequência, do Cerrado como um todo.

Glossário

Centrifugação - movimento com alta velocidade em um mesmo eixo.

Homogeneizar – misturar substâncias até que elas fiquem igualmente distribuídas em um recipiente.

In natura – significa “no estado em que se encontra na natureza”, “fresco”, “na natureza”.

Lise celular – ruptura da membrana que envolve a célula, fazendo com que esta libere seu conteúdo.

Sobrenadante – a parte superior de uma substância líquida.

Referências bibliográficas

Cordeiro, A.F.S.; Moraes, M.C.; Bertão, M.R.; Loose, P.V.; Palmieri, D.A. 2015. **Testes de aprimoramento na extração de DNA de *Annona crassiflora* Mart.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras, UNESP, Assis.