

COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA EM DIFERENTES TECIDOS DE PEIXE-REI PARA A ANÁLISE DE MARCADORES MOLECULARES

GARCIA, Verônica Hammes¹; TAVARES, Rafael Aldrighi²; NUNES, Marília Danyelle³; ALMEIDA, Diones Bender⁴; MOREIRA, Heden Luiz Marques⁵

1-Graduanda em Biologia, UFPEL veronica.hgarcia@gmail.com

2- Doutorando do PPGZ/FAEM/UFPEL rafaaldrighi@gmail.com

3- Mestranda do PPGZ/FAEM/UFPEL nunes.mdnunes@gmail.com

4- Doutorando do PPGZ/FAEM/UFPEL diones_almeida@yahoo.com.br

5- Professor adjunto III DZG/IB/UFPEL, Laboratório de Engenharia Genética Animal, UFPEL heden.luiz@gmail.com

DIONELLO, Nelson José Laurino

Professor do PPGZ/FAEM/UFPEL dionello@ufpel.edu.br

1 INTRODUÇÃO

O peixe-rei, *Odontesthes bonariensis*, é nativo da América do Sul: sudeste da Argentina e rio de La Plata e extremo sul do Brasil. No Brasil é encontrado na zona sul do estado do Rio Grande do Sul, Lagoas Mirim e Mangueira. (BRIAN, 2006).

Seu cultivo não é desenvolvido o suficiente para alcançar níveis comerciais, sendo a comercialização desta espécie praticamente através da coleta de populações naturais. Um ponto para alavancar o cultivo desta espécie, no Sul do Rio Grande do Sul, é a utilização do melhoramento genético dirigido. Ao se realizar este tipo de técnica, com base em uma grande variabilidade genética inicial, assegura-se a existência de variabilidade suficiente para se alcançar as melhorias desejadas para sucessivas gerações (RESENDE et al., 2008; POVH et al., 2009).

Em peixes os marcadores microssatélites estão sendo largamente aplicados para avaliar o tamanho efetivo da população, níveis de endogamia, estrutura populacional, fluxo gênico, parentesco e características quantitativas (MELO et al., 2008).

Para uma eficaz amplificação de sequências é necessária quantidade e boa qualidade de DNA amostral. Para isto é necessário a busca por métodos de extração eficazes para cada espécie e tecido de interesse, preferencialmente de baixo custo e o produto mais puro e íntegro possível.

A partir da necessidade de extração de DNA de peixe-rei, utilizados em programas de melhoramento genético, foram amostrados dois tipos de tecidos (nadadeira caudal e músculo) para a verificação de três protocolos (Fenol - Clorofórmio, Cloreto de Sódio, Acetato de Amônia), em busca de uma melhor amostra de DNA, sem resíduos e íntegro.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Amostras de aproximadamente 200-300mg de músculo e nadadeira caudal de cinco animais, coletados na Barragem do Chasqueiro localizada no município de Arroio Grande (32° 10'S 53° 00'O), Brasil, foram armazenadas em etanol 95% e preservadas a -20°C. Após a coleta as amostras submetidas a três protocolos diferentes: Fenol – Clorofórmio (BARDAKCI e SKIBINSKI, 1994); Cloreto

de Sódio (BARRERO et al., 2008) e Acetato de Amônia (Cloreto de Sódio modificado).

O Protocolo Fenol – Clorofórmio demanda tempo para ser realizado, sendo utilizadas para a purificação do DNA as substâncias fenol e clorofórmio, consideradas tóxicas para o organismo humano. As amostras foram colocadas em microtubos, e em seguida, adicionados 500 μ L de tampão de lise (100mM de Tris-HCL pH 7,4, 10mM de EDTA, 400mM de NaCl e 1% de SDS, 40 μ g/ml de RNase e 0,2% de SDS) e 3 μ L de proteinase K (200 μ g/ml). Estas foram incubadas em banho-maria a 40°C *overnight*. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-clorofórmio e uma com clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de volume de etanol absoluto onde permaneceu incubado por 24 horas a -20°C. Posteriormente o álcool absoluto foi retirado e adicionado álcool etílico 70%, centrifugado a 12000 rotações por minuto (rpm) e colocado em estufa a 40°C para evaporar o restante do etanol. Em seguida o DNA foi hidratado com água ultra-pura e estocado a -20°C.

O Protocolo Cloreto de Sódio é uma alternativa simples, fácil, rápida e não contaminante para a obtenção de DNA de boa qualidade em quantidades suficientes. Amostras de tecido de peixes foram colocadas em microtubos com 550 μ L de tampão de lise (50mM Tris-HC1, pH 8,0, 50mM EDTA, 100mM NaCl), contendo 1% SDS e 7 μ L de 200 μ g.mL⁻¹ de proteinase K. Os microtubos foram incubados imediatamente em banho-maria a 50°C por 12 horas. Em seguida, 600 μ L de NaCl 5M foram adicionados a cada amostra, antes de serem centrifugadas por 10 minutos a 12000rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos sendo o DNA precipitado com 700 μ L de etanol absoluto gelado e posteriormente incubado a -20°C por 2 horas. As amostras de DNA foram centrifugadas, lavadas com 700 μ L de etanol 70% e ressuspensas com 50 μ L em tampão TE (10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA), tratadas com 30 μ g.mL⁻¹ de RNase, e incubadas em banho-maria durante 40 minutos a 37°C. O DNA obtido foi mantido a -20°C.

O Protocolo Acetato de Amônia utiliza o mesmo princípio do protocolo anterior. Pedacos de tecido foram colocados em microtubos com 900 μ L de tampão de lise (10mM Tris-Base, 10mM EDTA, 2% SDS, pH 8,0), sendo adicionados 6 μ L de 200 μ g.mL⁻¹ de proteinase K. Os microtubos foram incubados imediatamente em banho-maria a 55°C *overnight*. Em seguida foram adicionados 4 μ L de RNase, agitados rapidamente no vortex e incubados a 37°C por uma hora. Após foram adicionados 300 μ L de acetato de amônia 7,5M e os microtubos agitados em vortex por 10 segundos. Os microtubos foram resfriados em gelo por aproximadamente 15 minutos e centrifugados a 13500rpm por três minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde o DNA foi precipitado com 900 μ L de isopropanol. As amostras de DNA foram centrifugadas, lavadas com 500 μ L de etanol 70% e ressuspensas com 50 μ L de água ultra-pura. O DNA obtido foi mantido a -20°C.

A integridade do DNA extraído, pelos três protocolos, foi analisada em gel de agarose 0,6%, corados com GelGreenTM (Biotium) e visualizados com radiação ultravioleta. A eletroforese do gel foi conduzida em 140 volts por 30 minutos, usando tampão TBE 0,5x (500mM de Tris-HCL, 60mM de ácido bórico e 83mM de EDTA).

A qualidade do DNA também foi testada através de reações de amplificações utilizando a técnica PCR. Para tanto, foi utilizado um primer específico para um determinado marcador microssatélite, com a seqüência 5'-TACTCAGCCTACCCTAATGCG-3' publicada no GenBank (AB375413.1) com um produto esperado de 223pb.

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 1µL de DNA genômico, 0,5µL *primer* (10pmol), 2,5µL de 1X *buffer* de PCR (10mM Tris HCl, 1,5mM MgCl₂ e 50mM KCl), 1,5µL MgCl₂ (25mM), 0,5µL de dNTP (100µM), 0,2µL de *Taq DNA polimerase*[®] (*Fermentas Life Sciences*) e 18,3µL de água livre de nuclease. O controle negativo (reação sem a presença de DNA) foi utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação.

As reações foram realizadas em um termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*[®] (*Eppendorf*). A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento de 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, terminando com uma extensão final de 8 minutos a 72°C.

A análise da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 0,6%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O protocolo Fenol - Clorofórmio apresentou visualmente a melhor qualidade e quantidade de DNA extraído, sem degradação e contaminação por proteína. Os protocolos Cloreto de sódio e Acetato de amônia apresentaram quantidades satisfatórias de DNA, porém o protocolo Cloreto de sódio apresentou aparentes níveis de degradação de DNA e o protocolo Acetato de Amônia aparente quantidade de RNA (Figura 1). Para Parpinelli e Ribeiro (2009), em uma boa extração apenas uma banda íntegra deve aparecer, pois rastros podem indicar degradação do DNA ou excesso de proteína, e outras bandas a presença de RNA.

Não ocorreu diferença entre a extração de tecido de músculo e nadadeira caudal. Parpinelli e Ribeiro (2009) analisaram três protocolos de extração de DNA (Fenol - Clorofórmio, NaCl e Brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB) em três diferentes tipos de tecido de tilápia do Nilo (nadadeira caudal, músculo e brânquias), concluindo que os melhores resultados quanto à concentração de DNA foram o de brânquias e nadadeiras. Em relação à pureza do DNA, o método de extração através do protocolo Fenol - Clorofórmio, para os tecidos de nadadeira, músculo e brânquias, parece ser o recomendado para estudos moleculares em peixes, por apresentar um grau de pureza considerado ideal.

Estudo realizado por Barerro et al. (2008) mostra que a extração de DNA, de nadadeira de peixe, com protocolo de extração usando sal (NaCl) obteve uma maior quantidade de DNA em comparação com o protocolo de extração de Fenol – Clorofórmio.

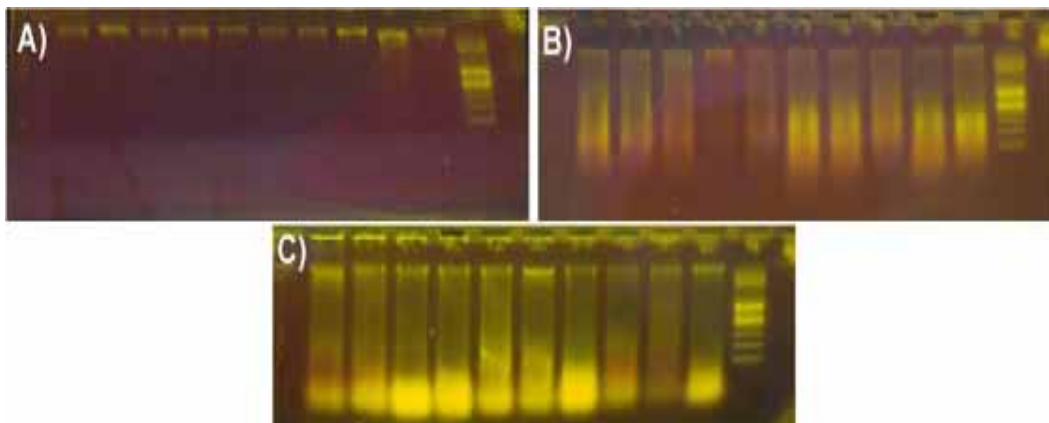


Figura 1 – Análise da extração de DNA em gel de agarose 1%. A) Protocolo Fenol – Clorofórmio, B) Protocolo Cloreto de Sódio e C) Protocolo Acetato de Amônia.

Todas as amostras obtidas das extrações apresentaram amplificação no teste de PCR realizado.

4 CONCLUSÕES

Os três protocolos utilizados possuem validade para a extração do DNA total de tecido de peixes, sendo os protocolos cloreto de sódio e Acetato de amônia, alternativas rápidas, de baixo custo e não contaminantes eficientes para extração de DNA para análise de marcadores moleculares de peixe-rei.

5 AGRADECIMENTO

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro. Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a equipe do Laboratório de Engenharia Genética Animal, ambos da UFPel, pelo apoio técnico.

6 REFERÊNCIAS

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species e subspecies identification. **Heredity**, v. 73, p. 117-123, 1994.

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 35, n. 1, p. 65-74, 2008.

BRIAN, S.D.H. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 69-88, 2006.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; SEERIG, A.; CARVALHO, D.C. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 220-224, 2008.

PARPINELLI, R.S.; RIBEIRO, R.P. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 22-33, 2009.

POVH, J.A.; RIBEIRO R.P.; BARRERO N.M.L.; GOMES P.C.; BLANCK D.V.; VARGAS L.; JACOMETO C.B.; LOPES T.S. Monitoramento da variabilidade genética de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1191-1195, 2009.

RESENDE, E.C.; RIBEIRO, R.P.; LEGAT, A.P.; BENITES, C. Melhoramento genético em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. **ADM – Artigo de divulgação na mídia**, v. 130, p. 1-4, 2008.