



DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DE DNA DE ALTO PESO MOLECULAR DE SOLOS COM ALTOS TEORES DE MATÉRIA ORGÂNICA

T.N.Silva-Macena; J.H. Amorim; G.V. Lacerda-Jr; J.C.T. Dias; R.P.Rezende; J.C.M.Cascardo
Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Biológicas. gilenolacerdajr@hotmail.com Rodovia Ilhéus-Itabuna, Km 16. Ilhéus BA.

INTRODUÇÃO

A necessidade e o potencial de identificação e bioprospecção de novos compostos é uma realidade. Existe uma grande possibilidade de haver potencial biotecnológico contido na porção não cultivável da microbiota ambiental, já que a quantidade de genes ainda não conhecidos na porção que representa em torno de 99% da microbiota ambiental é imensurável (Kim et al, 2005). A metagenômica é uma análise independente de cultivo que permite isolamento de DNA diretamente da amostra ambiental. A construção de bibliotecas metagenômicas aparece como uma poderosa ferramenta para explorar a diversidade microbiana do solo fornecendo acesso a informações genéticas de microrganismos não cultiváveis de solo. Tais bibliotecas, além de permitir a exploração biotecnológica dessas microbiotas, podem servir como base para estudos de filogenia dos ambientes (Rondon et al, 2000). A Mata Atlântica, bioma com grande diversidade biológica, tem enorme potencial como fonte de novas moléculas. Ela possui um solo rico em matéria orgânica, com componentes que interferem nas reações necessárias à exploração de seu potencial biotecnológico, especialmente o ácido húmico. O ácido húmico desnatura o DNA pela ligação de seus grupos fenólicos a amidas ou por serem oxidados e formarem quinonas que se ligam covalentemente ao DNA (Robe et al, 2003). A Taq polimerase é especialmente sensível ao ácido húmico e outros inibidores encontrados no solo. A inibição desta enzima pode inviabilizar ampliações via PCR, uma das principais técnicas aplicadas ao DNA extraído do solo em estudos de filogenia (Whitehouse & Hottel, 2006). Em estudos com fins biotecnológicos, como identificação de novas substâncias com aplicações médicas e industriais, além da necessidade de um DNA livre de contaminantes interferentes, o método de extração tem que proporcionar uma quantidade de DNA suficiente para as reações. E nestas situações, quanto mais DNA, melhor, visto que a representatividade da amostra aumenta, elevando a possibilidade de se encontrar um novo gene e

consequentemente, uma nova substância. Desta forma, conseguir extrair DNA em quantidade e qualidade adequadas à construção de uma biblioteca metagenômica de solo de Mata Atlântica tornou-se um desafio. Neste trabalho, buscou-se uma nova metodologia empregada em amostras de solo de Mata Atlântica e pela sua comparação com outra metodologia pré-existente.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostragem do Solo

O solo foi coletado na fazenda Caimbi em Ilhéus, Bahia. As amostras foram coletadas de 0 a 10 cm de profundidade. A análise de solos foi executada no Laboratório de Solos e Nutrição de plantas da EMBRAPA/CNMF, Cruz das Almas, Bahia.

2. Métodos de extração ex situ de DNA utilizados

Método A para extração ex situ de DNA de solo de Mata Atlântica (Maciel, 2004).

Em Erlenmeyer, adicionou-se 4 g de solo a 50 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,4 + Tween 80 a 0,1%, por 180 r.p.m por toda a noite. Distribuiu-se o sobrenadante em tubos de centrifuga com fundos cônicos. Centrifugou-se a 5000 r.p.m /10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Fez-se quatro lavagens em Tampão TE 50/50 mM, pH 8,1, seguindo de centrifugação de três minutos a 5000 r.p.m para cada lavagem, tendo sido descartado o sobrenadante. A lise das células foi feita por maceração do precipitado após congelamento com N₂ líquido. Ressuspendeu-se o macerado em 1 mL de TE 50/50 e adicionou-se 1 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) na proporção de 1:1 v/v. Coletou-se a fase superior e precipitou-se com isopropanol e acetato de sódio 3 M. Lavou-se duas vezes o precipitado em álcool 70%. Ressuspendeu-se em 100 µL de água ultra pura estéril. Purificou-se em coluna de Sephadex G-200.

Método B para extração ex situ de DNA de solo de Mata Atlântica (método utilizando glass beads)

Em Erlenmeyer, adicionou-se 4g de solo em 50 mL de tampão fosfato de sódio + Tween 80 a 0,1% em mesa agitadora por toda a noite. Distribuiu-se o sobrenadante em tubos de centrifuga com fundos cônicos. Centrifugou-se a 5000 r.p.m. /10 minutos e descartou-se o sobrenadante. Adicionou-se glass beads (pérolas de vidro) ao precipitado. Lavou-se quatro vezes em tampão PBS 1X, com centrifugação de 3 minutos a 5000 r.p.m. cada lavagem. Lavou-se em tampão TE 50/50 mM, por quatro vezes, com centrifugação de três minutos a 5000 r.p.m cada lavagem, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o precipitado em 3 mL desse tampão. Adicionou-se 200 µL de SDS a 20%. A lise das células foi feita por choque térmico do precipitado alternando N₂ líquido (1 min) e água em fervura (4 min) em 3 ciclos. Adicionou-se fenol/clorofórmio/ álcool isoamílico na mesma proporção. Coletou-se a fase superior e precipitou-se com isopropanol e acetato de sódio 3 M. Lavou-se o precipitado por duas vezes em álcool 70%. Ressuspendeu-se em 100 µL de água ultra pura estéril. Purificou-se por 1, 2 e 3 vezes passando na coluna de Sefhadex G-200.

3. Capacidade de amplificação via PCR das formas de purificação do método A e B

O DNA recuperado dos métodos A e B foram submetidos à PCR. A região amplificada foi a do gene 16S rDNA. Os primers utilizados foram 27f e 1525r.

4. Comparação do rendimento de DNA

Foi realizada uma análise espectrofotométrica para quantificar o rendimento de DNA de A e B. Também foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% para comparar visualmente este rendimento.

5. Capacidade de digestão por enzimas de restrição

O DNA extraído com o método B, foi comparado com o extraído pelo método A quanto à capacidade de digestão pelas enzimas EcoRI e BamHI, expôs-se 110 ng de DNA a 10 unidades de cada uma das enzimas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de amplificação via PCR do DNA purificado pelo protocolo A, não mostrou-se amplificável. Já para o protocolo B, apenas 1 e 2 mostraram-se amplificáveis. A forma 3, por apresentar grande perda de DNA durante o processo, não se mostrou amplificável, embora seus resultados de leitura em espectrofotômetro nas razões 260 /230 nm e 260 /280 nm tenham mostrado

nível aceitável de contaminação para eDNA (enviromental DNA). Esta metodologia funcionou muito bem para vários solos. A amplificação via PCR é uma boa estratégia de avaliação do nível de pureza do DNA, uma vez que envolve sucessivas reações enzimáticas. A acoplagem das DNA polimerases à molécula de DNA exige sítios livres de contaminação (ROH et al, 2006). Sendo assim, eDNA não amplificável em condições ótimas de reação provavelmente tem sua amplificação inibida por compostos, como os ácidos húmicos, que impedem a ação da Taq-DNA polimerase (Robe et al, 2003; Roh et al, 2006.).

Quanto ao rendimento de DNA e capacidade de digestão, obteve-se um rendimento de, em média, 596 ng/ mL, com o método B, enquanto com o método A, foi de, em média, 310 ng/mL, mostrando que em espectofotômetro o método B tem um rendimento quase duas vezes maior que o do método A. Essa diferença também foi observada pela análise de bandas após eletroforese de extratos dos métodos A e B. As Glass Beads foram adicionadas com o fim de aumentarem o número de células disponíveis, liberando-as das partículas de solo, desfazendo a adesão das células a estas partículas. A lise por choque térmico também contribui para um maior rendimento uma vez que, estando o material exposto a diferenças bruscas de temperatura, todas as células presentes sofrerão esta pressão, aumentando a eficiência de lise. A maceração, pode não expor tantas células à sua pressão de lise quanto o choque térmico, especialmente quando se leva em conta a habilidade manual no procedimento (Dubey et al, 2006).

O resultado de leitura na razão 260 /230 nm para DNA extraído com o método B foi, em média, 1,9, e com o método A, foi, em média, 1,25. Isso mostra que o método B também rende um DNA mais livre de ácidos húmicos que o do método A, visto que admite-se resultado igual ou maior que 2 na razão 260/230 nm para DNA livre de contaminação por ácidos húmicos (Roh et al, 2006).

O resultado de leitura na razão 260 /280 nm para DNA extraído com o método B foi, em média, 0,35 e 0,5 para DNA extraído com o método A, mostrando que ambos os DNAs estão livres de contaminação por proteína, tomando com referência o limite máximo de 1,7 (Roh et al, 2006). Essa diferença no nível de pureza acabou por interferir na digestão com as enzimas EcoRI e BamHI, onde o DNA extraído com o método B foi perfeitamente digerido pelas duas enzimas. Já o DNA extraído com o método A foi apenas parcialmente digerido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DUBEY, S.K.; et al., 2006. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. *Bioresource Technology*. 97: p. 2217-2224.
- KIM, Y.J. 2006. Screening and characterization of a novel esterase from a metagenomic library. *Protein Expression and Purification*. 45: p. 315-323.
- MACIEL, B.M. 2004. Tese de mestrado para obtenção do título de mestre em Genética e Biologia Molecular.
- ROBE, P. et al., 2003. Extraction of DNA from soil. *European Journal of Soil Biology*. 39: p. 183-190.
- ROH, C. et al., 2006. Comparative Study of Methods for Extraction and Purification of Environmental DNA From Soil and Sludge Samples. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 134: p. 97-112.
- RONDON M.R, et al., 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied Environmental Microbiology*. 66: p. 2541-2547.
- WHITEHOUSE, C.A. & HOTTEL, H.E. 2007. Comparison of five commercial DNA extraction kits for the recovery of *Francisella tularensis* DNA from spiked soil samples. *Molecular and Cellular Probes*. 21: p.92-96.