

Minipreparação de múltiplas amostras para extração de DNA total bacteriano em microplacas de 96 poços

Silva M.S.¹, Gama A.M.², Moraes A.B.¹, Nonato L.S.¹, Carvalho N.O.¹, Spira B.², Yamane T.^{3,4}, Mota .J.¹

¹UFAM - Universidade Federal do Amazonas, ²USP - Universidade de São Paulo ³UEA - Universidade do Estado do Amazonas, ⁴CBA – Centro de Biotecnologia da Amazônia
Emails: ssmarcelo1@hotmail.com, auri_matos@yahoo.com, adriane_abm@hotmail.com, luana_nonato@hotmail.com, nanicarvalhoss@gmail.com, benys@usp.br, tetsuo@usp.br, adolfo.mot@gmail.com

Resumo

Para acessar o DNA bacteriano, são empregados vários processos de rompimento da parede celular: aqueles baseados no uso de enzimas como lisozima e proteinase K; químicos, como o tiocianato de guanidina, e físicos, como maceração do material congelado, ou em agitadores na presença de esferas de vidro. Entretanto, várias metodologias em uso são normalmente demoradas e com muitas etapas, aumentando a probabilidade de contaminação resultante da excessiva manipulação e ainda a utilização recorrente de solventes orgânicos como o fenol e clorofórmio que geram resíduos tóxicos e danosos ao ambiente. Diante o exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um método prático e rápido de extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, ajustado para o padrão de microplacas de 96 poços. O protocolo apresentado nesse trabalho permite a extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, em quantidade e qualidade compatíveis com metodologias baseadas em PCR. O procedimento é rápido, prático e barato, tornando viáveis economicamente diversos trabalhos de prospecção de micro-organismos cultiváveis que necessitam de identificação molecular.

Palavras-chave: Genética de micro-organismos, extração do DNA.

Introdução

O primeiro passo de todas as técnicas que precisam acessar a informação genética é a extração dos ácidos nucleicos. Com exceção das metodologias que usam

RNA como a fonte inicial de informação genética, todas as demais que buscam determinar, manipular, reproduzir, modificar ou recombinar, necessitam em primeira instância de DNA em quantidade e qualidade que permitam seu processamento (Fiorentin et. al. 2009).

Para acessar o DNA bacteriano, são empregados vários processos de rompimento da parede celular: aqueles baseados no uso de enzimas como lisozima e proteinase K; químicos, como o tiocianato de guanidina, e físicos, como maceração do material congelado, ou em agitadores na presença de esferas de vidro. Entretanto, várias metodologias em uso são normalmente demoradas e com muitas etapas, aumentando a probabilidade de contaminação resultante da excessiva manipulação e ainda a utilização recorrente de solventes orgânicos como o fenol e clorofórmio que geram resíduos tóxicos e danosos ao ambiente.

Explorando as dificuldades citadas, a indústria da biotecnologia tem investido em alternativas viáveis e eficientes para superar tais limitações, os “kits” para extração de DNA e RNA trouxeram praticidade e ganho de tempo na bancada, entretanto o custo ainda é elevado, variando entre R\$ 20,00 e R\$ 30,00, por amostra, o que em geral obriga o pesquisador a rever estudos mais amplos, e eventualmente combinar amostras para reduzir os custos com a extração.

Diante o exposto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um método prático e rápido de extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, ajustado para o padrão de microplacas de 96 poços.

Material e métodos

Coleta e isolamento das amostras

Para reproduzir as condições de muitos trabalhos realizados com amostras ambientais, foram utilizadas bactérias oriundas de amostras coletadas do Rio Negro, Rio Araçá e Solimões. As coletas foram realizadas na profundidade de 15 cm, conforme determina CETESB (2011) para esse tipo de coleta, com o auxílio de garrafas devidamente esterilizadas.

As amostras coletadas foram diluídas sucessivamente em 0.9% Solução Salina até a concentração de 10^{-5} , e semeadas pela técnica de espalhamento de placa nos seguintes meios de cultura: Ágar Triptona de Soja (TSA) e Ágar Luria-Bertuni (LB) e Cetrimide Ágar; depois incubadas a 30° C pelo período de 24 horas.

Cultivo e extração de DNA

O protocolo foi modificado a partir de Mota e Nobrega (2013), que estabeleceram o método de minipreparação de DNA de leveduras em microplacas de 96 poços.

Algumas amostras selecionadas ao acaso foram inoculadas em uma microplaca de 96 poços fundo chato (Costar 96) com 300 µl de caldo TSA. Essas foram incubadas à 30° C por um período de 18h sem agitação.

Após o período de incubação, 50 µl da cultura foram transferidos para outra microplaca e centrifugadas a 3650 g, durante 10 min, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o excesso do meio de cultura foi drenado por inversão da placa em papel absorvente.

Foram adicionados 100 µL da solução de lise 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 2mg/ml lisozima), seguida de incubação à 37° C por 30 min; Para lise da membrana citoplasmática foram adicionados 10 µL de 10% SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e 5 µg de proteinase K, seguido de incubação a 55° C por 30 min, ou até a obtenção de uma solução translúcida, o que indica lise celular completa.

Para extração dos debris celulares e proteínas totais, foram adicionados 110 µl de 5M acetato de potássio, homogeneizando bem as amostras com aspirações sucessivas de forma cautelosa para não contaminar os poços adjacentes, seguido de incubação a -20 °C durante 30 min. O esperado para essa fase é um precipitado branco viscoso.

A placa foi então, centrifugadas a 3650 g por 15 min e 100 µl do sobrenadante foram transferidos para uma nova microplaca de fundo em “V” previamente preparada com 100 µL de álcool isopropílico em cada poço. A placa permaneceu a -20°C por 15 min seguido de centrifugação a 3650 g e 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado uma vez com 200 µL de 70% etanol, seguido de centrifugação a 3650 g por 5 min, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado permaneceu à temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual. O DNA foi hidratado com 30 µL tampão de TE/RNAse (10 mM Tris HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA e 10 µg.ml⁻¹ RNAse). Cinco microlitros de cada extrato foram aplicados em gel de agarose 0,8 % corado com 0.2 µg.ml⁻¹ brometo de etídio. O DNA total também foi analisado em NanoDrop2000c para se determinar quantidade e qualidade das amostras.

Resultados e discussão

Foram testados com esse protocolo aproximadamente 300 isolados, e após o período de incubação, houve massa celular suficiente para a realização das extrações para a maioria das amostras. Nessa etapa é desnecessário determinar o crescimento celular, como o protocolo visa objetividade, havendo turvação mínima do meio já se atinge o número suficiente de células para uma extração com bom rendimento. Entretanto, para isolados de crescimento rápido onde grande massa celular é atingida em um período curto, a diluição das células torna-se necessária, pois a quantidade elevada de massa celular satura o tampão de extração dos debris celulares, e portanto a qualidade dos produtos de extração cai.

Tentativas em usar um tampão de extração sem proteinase K renderam bem menos DNA por amostra e em muitos casos, não houve produto que pudesse ser visualizado em gel de agarose, dessa forma optamos por manter a enzima no tampão. O tempo de incubação com o tampão de lise 2 é variável, a lise de algumas amostras ocorre quase que instantaneamente, outras, porém, demoram mais, entretanto, em nossos ensaios, 20 min foram suficientes para a lise completa de todas as amostras testadas que pode ser facilmente constatada pela transição de uma solução turva para uma solução cristalina.

Foi possível extrair DNA de todas as amostras isoladas o que sugere um protocolo de extração eficiente para os mais diversos tipos bacterianos e com diferentes estruturas de parede (Fig. 1).

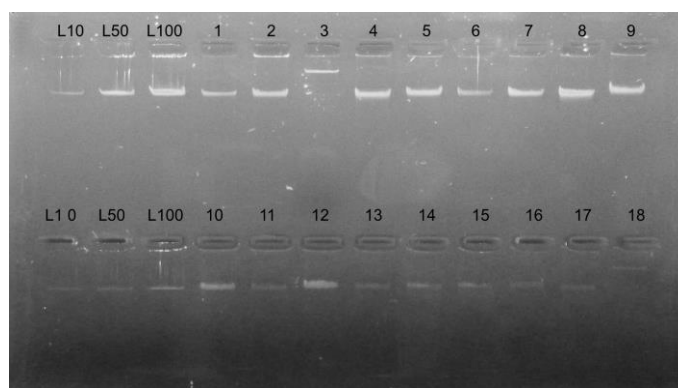


Figura 1. Gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídio. Perfil eletroforético do DNA total bacteriano extraído. L10, L50 e L100, marcador lambda contendo 10, 50 e 100 ng de DNA respectivamente. Números de 1 a 18, isolados testados nesse estudo. Imagem representativa.

A quantidade média de DNA total extraído foi de 200 ng/μl, sendo a menor concentração 108 ng/μl e a maior, 476 ng/μl. As diferenças observadas se devem, em geral, à massa celular, algumas bactérias conseguem atingir uma maior densidade que se reflete diretamente no produto da extração.

Existem diversas técnicas para extração de DNA bacteriano a partir de amostragem ambiental, entretanto, nenhum método é universalmente aplicável, já que algumas amostras, devido à sua própria natureza, requerem a adaptação do método (Zhou et al., 1996). Com o protocolo de extração proposto nesse trabalho foi possível realizar a extração de DNA de todos os isolados. As diferenças entre os isolados, nas quantidades de DNA extraído, podem ser explicadas pelo crescimento diferencial apresentado pelas diferentes amostras.

A quantidade total de DNA extraído varia dentro da escala de nanograma, o que é suficiente para todas as metodologias que usam como base a PCR. Para técnicas que necessitam de maior quantidade de DNA (escala de micrograma) ou um DNA com excelente grau de pureza esse não é o método mais indicado.

O grande diferencial do protocolo proposto nesse trabalho é que ele permite a extração de DNA total de múltiplos isolados bacterianos simultaneamente, em microplacas de 96 poços. Além disso, há uma redução significativa no número de passos e a utilização de solventes orgânicos quando comparado com metodologias muito difundidas como a extração com fenol e clorofórmio.

Levando-se em consideração a diversidade cultivada, este método se apresenta como uma alternativa viável para trabalhos que precisam genotipar um grande número de amostras ambientais. A extração de DNA em geral é uma dificuldade para a maioria desses trabalhos, por dois motivos básicos: custo e tempo.

Todas as etapas de identificação molecular subsequentes à extração já são feitas com a manipulação simultânea de múltiplas amostras usando microplacas com 96 poços, sendo as mais comuns, PCR e sequenciamento. Dessa forma, o presente método certamente é uma contribuição importante, principalmente para a realidade da região Norte, onde pesquisas envolvendo prospecção de micro-organismos resultam em um grande número de isolados armazenadas e identificadas em criotubos de preservação.

Conclusões

O protocolo apresentado nesse trabalho permite a extração de DNA bacteriano de múltiplas amostras simultaneamente, em quantidade e qualidade compatíveis com metodologias baseadas em PCR.

O procedimento é rápido, prático e barato, tornando viáveis economicamente diversos trabalhos de prospecção de micro-organismos cultiváveis que necessitam de identificação molecular.

Referências

Fiorentin, F.; Moraes, A.J.; Celant, V.A.; Bonett, L.P. (2009). Testes de extração de DNA de *Anticarsia gemmatalis* e *Spodoptera frugiperda* usando o protocolo miniprep (modificado de Raeder; Broda, 1985). Anais do I Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, 28 a 30 de abril de 2009. UNIOESTE, Cascavel – Paraná – Brasil.

Miranda, R.R., Montanhini, M.T.M., Boreiko, S., Bittencourt, J.V.M. (2011). Evaluation of genomic dna extration from food interest bactéria. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Org. Carlos Jesus Brandão et al., São Paulo: CETESB; Brasília: ANA.

Mota, A.J., Back-Brito G.N., Nobrega F.G. (2009). "A practical and rapid microplate method for yeast genomic DNA extraction." MYCOSES. Vol. 52. Commerce Place, 350 Main ST, Malden 02148, MA USA: Wiley-Blackwell Publishing, INC.