



Extração de DNA de plantas

Eduardo Romano, *Biólogo Molecular, M.Sc.*
Ana Cristina Miranda Brasileiro, *Bióloga Molecular, Ph.D.*
CENARGEN/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
romano@cenargen.embrapa.br

SOLUÇÕES PARA PROBLEMAS COMUMENTE ENCONTRADOS

O isolamento de DNA de plantas e de material vegetal proveniente de cultura de tecidos é uma etapa importante na análise da estrutura e organização do genoma de plantas. Essas análises necessitam, freqüentemente, usar enzimas de restrição, que cortam o DNA em fragmentos, para ser que é utilizado em *Southern blot* ou em construção de bibliotecas genômicas. Preparações de DNA vegetal também são, comumente, utilizadas como substratos em reações de PCR para estudos filogenéticos ou no desenvolvimento de marcadores moleculares como os microsátélites e os gerados por RAPD. Independente do tipo de estudo molecular, as preparações de DNA devem produzir amostras puras suficientes para não inibir os tratamentos enzimáticos ou causar interferências nos padrões de migração em gel de eletroforese.

Algumas considerações são importantes na obtenção de DNA de boa qualidade e devem ser atendidas independente do método utilizado.

1) As paredes celulares devem ser rompidas com o objetivo de liberar os constituintes celulares. Essa etapa é realizada geralmente pelo congelamento do tecido vegetal em nitrogênio líquido e posterior quebra mecânica, com o auxílio de um pilão e de um almofariz, no caso de extração em larga escala. Para extração em pequena escala, utiliza-se um pequeno bastão de vidro e um tubo

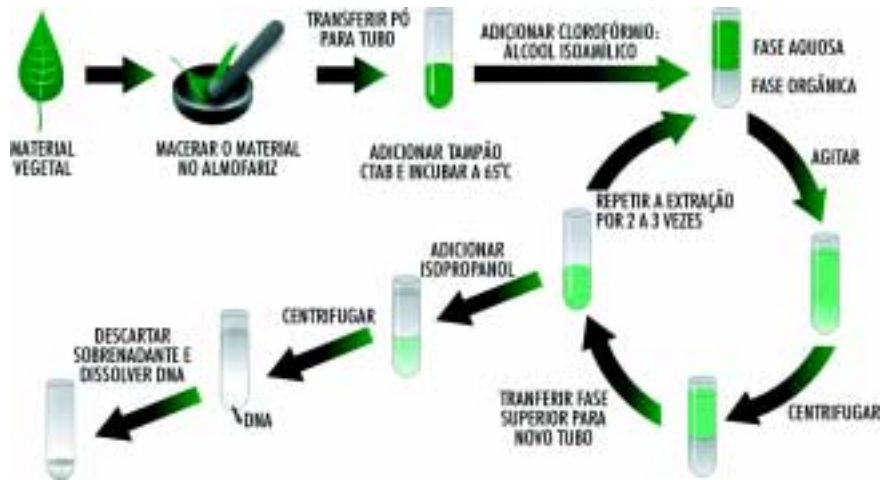


Figura 1: Esquema representativo das etapas de extração de DNA pelo método CTAB.

de microcentrífuga. Nesse caso, as preparações freqüentemente se destinam a reações de PCR e podem ser realizadas somente na presença de tampão de extração, sem a adição de nitrogênio líquido.

2) As membranas celulares devem ser rompidas para liberação do DNA. Essa etapa é realizada pela ação de um detergente como SDS (dodecil sulfato de sódio) ou CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio).

3) Deve-se evitar a ação de DNAsas, que podem degradar o DNA. Com esse propósito, os tampões de extração possuem pH por volta de 8,0, enquanto o pH ótimo para ação de DNAsas endógenas fica por volta de 7,0. Outro expediente empregado é a adição de EDTA (ácido etileno diamônio tetracético) no tampão de extração. O EDTA é uma substância quelante de cátions divalentes, como Mg^{+2} e Ca^{+2} e, portanto, inibe a ação

de DNAsas, que usam esses metais como cofatores (Sambrook *et al.*, 1989).

4) Ácidos nucleicos devem ser separados das proteínas. Para tanto, realiza-se de uma a várias extrações com fenol e/ou clorofórmio, que desnaturam as proteínas tornando-as insolúveis à fase aquosa, onde se encontram os ácidos nucleicos.

5) O DNA deve ser protegido da ação de compostos fenólicos, que oxidam o DNA irreversivelmente, tornando este inacessível às enzimas de restrição. A contaminação por compostos fenólicos pode ser evidenciada pela coloração do DNA que tende a ficar marrom. Para evitar o efeito oxidativo dos polifenóis, deve ser adicionado ao tampão de extração agentes anti-oxidantes, como PVP (polivinilpirrolidona), BSA (albumina de soro bovino) ou β -mercaptoetanol.

6) Os ácidos nucleicos devem ser separados de polissacarídeos. Esses inibem a ação de enzimas de restrição (Shioda & Marakami-Muofushi, 1987) e tornam a amostra de DNA excessivamente viscosa, interferindo na migração do DNA em corridas eletroforéticas. O detergente CTAB é utilizado com essa finalidade, já que polissacarídeos e ácidos nucleicos possuem solubilidade diferenciada na presença desse detergente. Polissacarídeos também podem ser removidos pelo emprego de gradiente de cloreto de céσιο (CsCl).

Vários autores descrevem problemas no isolamento e purificação de DNA vegetal de boa qualidade (para uma revisão ver: Rogers & Bendich, 1994). Esses problemas são resultantes principalmente do co-isolamento de polissacarídeos, substâncias fenólicas e compostos secundários.

O método mais utilizado com sucesso para diferentes espécies é o baseado no uso do detergente CTAB. Esse detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (Weising *et al.*, 1995). A maioria dos

protocolos descritos na literatura utilizam o protocolo CTAB padrão, com algumas modificações, com vistas a resolver problemas específicos da espécie em estudo. Outros protocolos freqüentemente empregados são variações do descrito por Dellaporta e colaboradores (Dellaporta *et al.*, 1983). Esses métodos se fundamentam na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos na presença de SDS e altas concentrações de acetato de potássio. Outro método utilizado é a extração de DNA por meio de núcleos celulares. Essa estratégia é baseada em uma prévia separação dos núcleos dos outros constituintes celulares. Esse procedimento pode resolver o problema de co-isolamento de constituintes indesejáveis, como os polissacarídeos e polifenóis citoplasmáticos. A principal desvantagem deste método é que a extração de núcleos a partir de material congelado é muito ineficiente. Outra desvantagem é que esse método é mais laborioso do que os previamente mencionados. As preparações de DNA obtidas por qualquer um desses métodos podem sofrer uma posterior purificação por centrifugação em gradiente de densidade de CsCl. Essa purificação, apesar de laboriosa, é eficiente na remoção de RNA, polissacarídeos, proteínas e outros contaminantes da amostra de DNA. Outra estratégia para purificação do DNA isolado é a precipitação com acetato de amônio. Essa estratégia é mais rápida, porém o DNA purificado é de menor qualidade.

Nesse artigo descrevemos um protocolo CTAB padrão utilizado com sucesso em nosso laboratório, em diferentes espécies, e dois protocolos de purificação (gradiente de CsCl e acetato de amônio). Apresentamos também uma tabela (tabela 1), onde são identificados os problemas comumente encontrados na extração de DNA por meio do protocolo CTAB. Dessa forma, o leitor poderá identificar o problema e tentar fazer as modificações necessárias para melhorar a qualidade do DNA. Na tabela 2, estão listadas algumas espécies vegetais para as quais foram necessárias adaptações de protocolos básicos, visando à resolução de problemas específicos.

Tabela 1: Problemas comumente encontrados durante o isolamento de DNA de plantas; possíveis causas e soluções.

Problema encontrado	Causa	Solução
Amostra de DNA marrom ou muito escura.	Contaminação por polifenóis.	Adição de PVP-40 e/ou BSA no tampão de extração, a concentração de 1 a 2%. Aumento da concentração de β -mercaptoetanol para até 5%.
Amostra de DNA com aspecto gelatinoso e excessivamente viscoso.	Contaminação por polissacarídeos.	Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio.
O DNA, antes da digestão com enzimas de restrição, apresenta arraste vertical no gel.	DNA degradado por contaminação por DNAses ou por quebra mecânica durante a extração com clorofórmio.	Extrato de DNA via núcleos celulares. Verificar o pH do tampão de extração. Este deve estar por volta de 8,0. Se o pH estiver por volta de 7,0 facilitará a ação de DNAses durante a extração. Mistura das fases aquosa e de clorofórmio menos vigorosamente.
O DNA apresenta forma cônica no gel, em direção ao pólo positivo.	Excesso de DNA aplicado no gel. Contaminação por polissacarídeos.	Aplicar menos DNA no gel. Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio; Extração de DNA via núcleos celulares.
Após a corrida, muito DNA retido no poço do gel.	Contaminação por polissacarídeos.	Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio; Extração de DNA via núcleos celulares.
Após digestão com enzima de restrição, a amostra apresenta uma corrida com muito DNA nas laterais e pouco DNA no centro.	Contaminação por polissacarídeos. Excesso de DNA aplicado no gel.	Purificação da amostra em gradiente de CsCl ou por precipitação com acetato de amônio; Extração de DNA via núcleos celulares; Aplicação de menos DNA no gel.
O DNA no gel apresenta contaminação com RNA.	Contaminação por RNA.	Adicionar RNase A, a uma concentração final de 100 μ g/mL e incubar a 37°C por 20 minutos.

Tabela 2 - Principais espécies vegetais para as quais foram necessárias adaptações de protocolos básicos, visando à resolução de problemas específicos (adaptado de Weising et al. 1995).

Espécie vegetal	Protocolos utilizando tampões CTAB	Protocolos baseados na precipitação de proteínas e polissacarídeos com acetato de potássio/SDS (Dellaporta)	Protocolos envolvendo o isolamento de núcleo	Protocolos mistos
<i>Abies alba</i> (abeto)				X
<i>Betula alba</i> (bétula)				X
<i>Glycine max</i> (soja)	X		X	
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)	X		X	X
<i>Fragaria x ananassa</i> (morango)				X
<i>Helianthus annuus</i> (girassol)				X
<i>Hordeum vulgare</i> (cevada)	X			
<i>Ipomoea batatas</i> (batata-doce)	X	X		
<i>Linum usitatissimum</i> (linho)	X			
<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	X	X		
<i>Musa acuminata</i> (bananeira)	X			
<i>Nelumbo spp.</i> (lótus)	X			
<i>Nicotiana tabacum</i> (fumo)			X	X
<i>Oryza sativa</i> (arroz)		X		
<i>Picea abies</i> (aberto)				X
<i>Pisium sativum</i> (ervilha)			X	
<i>Prunus persica</i> (pessegueiro)	X			
<i>Saccharum spp.</i> (cana-de-açúcar)	X		X	
<i>Solanum tuberosum</i> (batata)	X	X		
<i>Theobroma cacao</i> (cacaueiro)			X	
<i>Vicia faba</i> (fava)		X		X
<i>Vitis vinifera</i> (videira)			X	
<i>Zea mays</i> (milho)				X

Protocolos

Isolamento de DNA total de plantas utilizando-se o método CTAB (Figura 1)

1. Pese 3 g do material vegetal a ser analisado (calos, folhas, plântulas etc.), de preferência fresco, e transfira para um almofariz contendo com nitrogênio líquido. Com o auxílio de um pilão,

pulverize o material até se obter um pó fino.

2. Transfira rapidamente o pó obtido para um tubo de polipropileno de 50 ml que contenha 15 ml de tampão CTAB [CTAB 2% (p/v); NaCl 1,4 M; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM; β -mercaptoetanol 0,2% (v/v)] pré-aquecido a 65°C. Feche o tubo e misture gentilmente até o pó ficar homogêneamente distribuído.

3. Incube as amostras em banho-maria a 60°C por 30 minutos, agitando ocasionalmente o tubo para manter o extrato ressuspenso.

4. Retire o tubo do banho-maria e espere que a mistura atinja a temperatura ambiente. Adicione 15 ml de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1; v/v). Feche o tubo e misture manualmente por 10 minutos.

5. Centrifugue a 5.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente, para separar a fase orgânica da aquosa.

6. Remova a fase aquosa (fase superior) para um tubo novo de 50

ml. Evite pegar qualquer proteína desnaturada presente na interface.

7. Repita a extração com clorofórmio:álcool isoamílico mais uma ou duas vezes (etapas de 4 a 6), levando em consideração que mais extrações podem tornar a amostra mais pura, porém com maiores perdas de DNA.

8. Adicione RNase A a uma concentração final de 100 μ g/ml e incube a 37°C por 30 minutos. Essa etapa é opcional e contribui para aumentar a pureza da sua amostra.

9. Adicione 0,6 volume de isopropanol ou 2,5 volumes de etanol absoluto, ambos a -20°C. Misture suavemente até formar um precipitado.

10. Se o complexo DNA-CTAB obtido formar uma rede de filamentos visíveis, recupere o DNA com o auxílio de uma pipeta. Caso o DNA não forme uma rede visível, centrifugue a amostra a 10.000 g por 20 minutos. Em uma boa preparação, o DNA não deve estar escuro. Sempre que possível, evite a etapa da centrifugação para não co-precipitar o DNA e polissacarídeos.

11. Descarte o sobrenadante e lave o precipitado com 5 ml de etanol 70% (v/v). Caso o precipitado se solte durante a lavagem, repita a etapa da centrifugação por 3 minutos (etapa 10).

12. Descarte o sobrenadante e seque o precipitado invertendo o tubo em um papel-toalha.

13. Dissolva o precipitado em 500 μ l de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e incube a 4°C por meia hora ou mais. A amostra pode ser então armazenada a -20°C.

14. Uma purificação posterior pode ser realizada por tratamento com acetato de amônio ou por gradiente de cloreto de cézio.

Purificação de DNA total de plantas por tratamento com acetato de amônio

1. Dissolva o DNA isolado em 1,0 ml de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e adicione 500 μ l de acetato de amônio a 7,5 M.

2. Feche o tubo e misture suavemente por inversão para homogeneizar a solução. Incube no gelo por 15 minutos.

3. Centrifugue por 30 minutos a 10.000 g a 4°C. Transfira o sobrena-

Para maiores informações sobre técnicas de isolamento e análise de DNA de plantas, consulte o "Manual de Transformação Genética de Plantas" (Brasileiro & Carneiro, 1998). Nele são apresentadas diferentes técnicas utilizadas na transformação de plantas, assim como experimentos para a detecção de genes repórteres e análise moleculares da integração de genes em plantas. Para adquirir o manual, acessar via Internet a home page da Embrapa no endereço:

<http://www.spi.embrapa.br>

dante para um novo tubo.

4. Adicione 2 volumes de etanol absoluto ao sobrenadante e misture suavemente por inversão. Incube por 1 hora a -20°C.

5. Centrifugue por 10 minutos a 5.000 g a 4°C.

6. Lave o precipitado com etanol 70% (v/v) e centrifugue novamente nas mesmas condições por 3 minutos.

7. Seque o precipitado e dissolva em 500 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Conserve a solução a -20°C.

8. Caso seja necessário, proceda a uma repurificação por gradiente de cloreto de céσιο.

Purificação de DNA total de plantas por gradiente de cloreto de céσιο (CsCl) (Figura 2)

1. Dissolva o DNA isolado em 6,5 ml de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) e transfira a solução para um tubo de ultracentrífuga de 10 ml.

2. Adicione 7 g de CsCl, feche o tubo e misture a solução por inversão. Caso necessário, aqueça a solução em um banho-maria a 30°C para facilitar a dissolução.

3. Adicione 700 µl de brometo de etídio a 0,1% (p/v). Feche o tubo e misture gentilmente por inversão para homogeneizar a solução. A partir dessa etapa, proteja seu tubo com um papel-alumínio para evitar exposição à luz ambiente, que po-

derá danificar o DNA na presença do brometo de etídio.

4. Centrifugue a 45.000 rpm (rotor Vti65) por 16 horas, em uma ultracentrífuga, a 20°C.

5. Após a formação do gradiente, visualize a banda correspondente ao DNA sob luz ultravioleta (320 nm). Colete cuidadosamente a banda com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transfira para um novo tubo de vidro de 15 ml.

6. Remova o brometo de etídio adicionando à solução que contém DNA 1 volume de 1-butanol ou álcool isoamílico, ambos saturados em água. Feche o tubo e misture gentilmente por inversão até que uma única fase se forme.

7. Centrifugue por 3 minutos a 1.500 rpm (rotor SS34) a temperatura ambiente, para separar a fase orgânica da aquosa. Descarte a fase orgânica (fase superior), que contém o brometo de etídio, com o auxílio de uma pipeta Pasteur.

8. Repita a extração por quantas vezes forem necessárias para eliminar qualquer vestígio de brometo de etídio (a cor rosa deve desaparecer completamente das fases orgânica e aquosa).

9. Remova o cloreto de céσιο precipitando o DNA pela adição de 2 volumes de água destilada e 6 volumes de etanol absoluto. Incube por 30 minutos a 4°C.

10. Centrifugue a 12.000 rpm (rotor SS34) durante 30 minutos, a 4°C. Descarte o sobrenadante e dissolva o precipitado em 500 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM). Conserve a solução a -20°C.

11. Quantifique a amostra de DNA através de leitura espectrofotométrica, medindo a absorbância da solução no comprimento de onda de 260 nm. A concentração de DNA da amostra será dada pela seguinte fórmula:

$$[\text{DNA}] = 50 \mu\text{g/ml} \times D \times A_{260};$$

onde: D é o fator de diluição usado para fazer a leitura espectrofotométrica e A_{260} é a leitura obtida no comprimento de onda de 260 nm.

Referências

Brasileiro ACM, Carneiro VTC (eds) (1998) Manual de Transformação Genética de Plantas. Brasília, Embrapa-SPI/Embrapa-Cenagen. 309 p.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol Biol Rep 1: 19-21.

Rogers SO, Bendich AJ (1994) Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. In: Gelvin SB, Schilperroort RA (eds) Plant molecular biology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shioda M, Marakami-Muofushi K (1987) Selective inhibition of DNA polymerase by a polysaccharide purified from slime of *Phisarium polycephalum*. Biochem Biophys Res Commun 146:61-66.

Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W (1995) DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton. 🌱

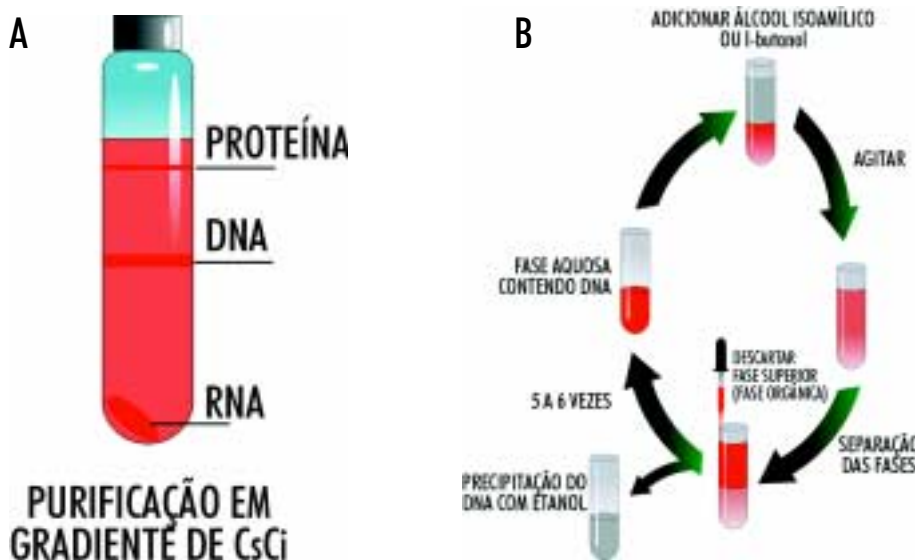


Figura 2: Purificação de DNA total de plantas por meio de gradiente de cloreto de céσιο. (A) Separação dos diferentes componentes presentes na solução após o isolamento do DNA total e ultracentrifugação em rotor de ângulo fixo. (B) Eliminação do brometo de etídio da solução de DNA.