

ANÁLISE DE PROTOCOLOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA DE FOLHAS DE CAFEIEIRO

Thais Cainã Teixeira Valente¹; Ana Cristina Andrade Monteiro²; Vanessa Foresti Pereira²; Pedro Martins Ribeiro Júnior²; Camila Aparecida Carvalho²; Mário Lúcio Vilela de Resende².¹ Departamento de Biotecnologia – UFLA, email: thaistv7@hotmail.com; ² Departamento de Fitopatologia - UFLA

O isolamento de RNAs de alta qualidade é essencial no estudo da expressão gênica durante a interação planta-patógeno. Folhas de caféiro contêm altos níveis de compostos fenólicos, que contaminam os RNAs durante sua extração, afetando assim a qualidade e a quantidade do RNA isolado. Diante disso, a técnica para obtenção de RNAs de alta qualidade é uma das etapas mais importantes nos experimentos de Biologia Molecular.

Neste contexto, o presente trabalho objetivou testar quatro métodos de isolamento de RNAs totais de folhas de caféiro para a utilização na análise de expressão por RT-PCR.

Folhas de mudas de caféiro da cultivar Mundo Novo com 6 meses de idade foram coletadas, envolvidas em papel alumínio, identificadas, imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultra freezer (-80°C) até o momento da extração do RNA total. Todos os materiais utilizados para extração (cadinhos e pistilos de porcelana, microtubos, ponteiras e água destilada) foram tratados com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) para inativar RNases. Os materiais foram submersos em DEPC 0,05% (v/v), *overnight* e autoclavados por 20 minutos. O DEPC inativa RNases, nucleases que degradam RNA.

As folhas armazenadas foram trituradas até a obtenção de um pó fino. Em cada microtubo foi adicionado aproximadamente 100 mg do material triturado. O teste de extração de RNA foi realizado no laboratório de Fisiologia do Parasitismo, localizado no Departamento de Fitopatologia da UFLA. Dentre os métodos testados para extração dos RNAs totais de tecido vegetal de caféiro, dois foram o Pine Tree e o Chang modificado, à base brometo de cetil-trimetilamônio (CTAB) conforme Chang et al.(1993). Os outros protocolos testados foram o método à base de fenol de acordo com Xiahong (2000) e o método utilizando o reagente comercial *TRIzol® Reagent* (Invitrogen™).

As amostras extraídas com Trizol apresentaram concentração baixa de RNA e a relação 260/280 se encontra fora do padrão de qualidade (Tabela 1). A relação ideal é entre 1,80 e 2,00. Já as amostras extraídas pelo método do Fenol e Chang modificado apresentaram uma maior concentração em relação ao Trizol, mas a relação do Fenol foi inferior a do Chang modificado e superior ao desejado (Tabela 1). Além disso, todas as amostras extraídas pelo método do Chang modificado sofreram um arraste no gel, constatando que a qualidade do RNA foi baixa (Figura 1). De acordo com a Figura 1 e a Tabela 1, pode-se observar que as amostras extraídas pelos métodos do Fenol e Pine Tree obtiveram uma qualidade visivelmente superior no gel de agarose e também em relação à média das concentrações, 1071,13 e 811,16 ng/mL, respectivamente. No entanto, pode-se inferir que, quando comparadas as relações 260/280nm e 260/230nm, o método do Pine Tree é o que mais se aproxima do ideal, com uma média de 2,06 e 1,95, respectivamente. A extração de RNA utilizando-se o método Pine Tree apresentou uma boa manutenção da conservação das moléculas de RNA, além disso, apresentou maior quantidade de RNAs totais.

Tabela 1. Quantificação das amostras com a concentração em ng de RNA/ μ L e as relações que se referem à qualidade.

Amostras	ng/ μ L	260/280nm	260/230nm
Trizol a	709,9	1,70	0,88
Trizol b	189,7	1,54	0,44
Trizol c	296,8	1,59	0,60
Trizol d	254,5	1,32	0,57
Fenol a	415,0	0,94	3,44
Fenol b	664,8	1,39	1,08
Fenol c	2740,7	1,46	1,18
Fenol d	463,9	1,40	1,08
Chang mod. a	816,1	2,10	2,24
Chang mod. b	866,4	2,14	2,85
Chang mod. c	785,9	2,11	2,76
Chang mod. d	617,7	2,14	3,11
Pine Tree a	939,8	2,05	1,93
Pine Tree b	587,3	2,06	1,70
Pine Tree c	1191,2	2,02	2,12
Pine Tree d	526,3	2,11	2,06

Dentre os protocolos de extração de RNA testados, o método do Pine Tree é o mais indicado para isolamento de RNA em folhas de caféiro, pois as amostras apresentaram concentração satisfatória e uma boa qualidade do ácido nucléico.

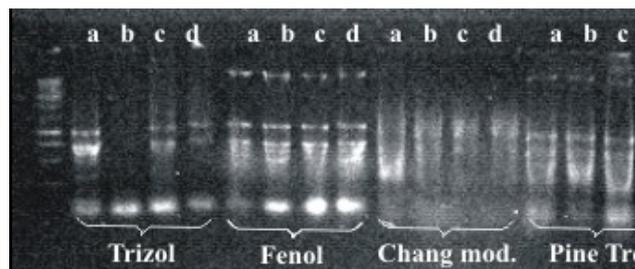


Figura 1. Gel de agarose 1%, corado com gel Red, de RNA extraído de folhas de caféiro utilizando-se os seguintes protocolos: Trizol, Fenol, Chang modificado e Pine Tree. As letras a, b, c e d correspondem às repetições. Marcador de 1 kb ladder.