



ESTUDO DE TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA USO EM PESQUISAS DE POLIMORFISMOS DE GENES DE RESPOSTA IMUNE.

Andressa Higa Shinzato (PIBIC/FA), Mariane Higa Shinzato, Luciana Conci Macedo, Jean Lucas Meneguetti, Hugo Vicentin Alves, Marcia Machado de Oliveira Dalalio, Jeane Eliete Laguila Visentainer (Orientadora), e-mail: dessa_higa@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Ciências Biológicas - Imunologia

Palavras-chave: Extração de DNA, Salting-out, Biopur

Resumo:

O ácido desoxirribunucleico (DNA) está presente no núcleo de todas as células do organismo, com exceção das hemácias. Trata-se de uma molécula na qual estão contidas informações únicas dos indivíduos. Por isso, a utilização do DNA é importantíssima nos estudos de genética molecular em humanos. No entanto, a escolha do método adequado para extração do DNA é difícil uma vez que inúmeros fatores estão envolvidos como custo-eficácia, tempo, biodisponibilidade de reagentes e equipamentos, pureza e concentração de DNA desejado. Por essa razão, esta pesquisa teve como objetivo determinar a metodologia adequada de extração de DNA (Técnica de salting-out x Biopur®) para cada polimorfismo de genes de resposta imune estudado no laboratório. Os resultados mostraram que as concentrações obtidas pela técnica de salting-out foram superiores quando comparados à técnica de Biopur®, embora o produto da digestão visualizado em gel foi equivalente ao comparar as duas técnicas.

Introdução

Muitos testes genéticos envolvidos em estudos de doenças humanas necessitam da utilização do DNA genômico extraído de amostras de sangue. Essa extração do ácido nucleico é tida como um passo fundamental em





procedimentos laboratoriais requeridos para realizar mais e novas pesquisas moleculares (1). De fato, a extração a partir de amostras biológicas é o primeiro passo para realizar diversas técnicas moleculares tais como a reação em cadeia de polimerase (PCR), detecção de mutações e genotipagens (2). A escolha do método ideal de extração do DNA deveria englobar os seguintes critérios: ser sensível, consistente, rápido e fácil de usar, apresentar mínimos riscos ao pesquisador e ao sujeito da pesquisa, ser um método com zero ou mínimo risco de contaminação cruzada das amostras e, o mais importante, que no final, possa obter amostras puras de DNA (3). Infelizmente, não há um método de extração que atenda todas a essas exigências em um mesmo protocolo. Por isso, é essencial escolher o método mais adequado de acordo com cada estudo (4).

Materiais e Métodos

Nessa pesquisa foram usadas amostras de *buffy-coat*, as quais foram extraídas pelo kit de coluna Biopur® e pelo método modificado de Salting-out. A pureza e concentração de DNA foram verificadas pelo aparelho Nanodrop®. As amostras foram testadas pela técnica de PCR-RFLP e PCR-SSP para cada polimorfismo de genes de citocinas (*IL8*, *IL17* e *TNF*) e *HLA-B*27*, respectivamente.

Resultados e Discussão

As amostras extraídas por salting-out e pela técnica de Biopur® foram, primeiramente, avaliadas com relação à concentração de DNA obtida (Tabela 1). As concentrações de DNA obtidas foram superiores em todas as amostras extraídas (N=35) pela técnica de salting-out quando comparadas com as extraídas pela técnica de Biopur®.

Tabela 1. Comparação das concentrações de DNA e relação 260/280 obtidas na dosagem pelo Nanodrop entre as amostras extraídas pela Técnica de Salting-out x Biopur®.

	Salting-out Concentração (ng/μl)	260/280	Biopur® Concentração (ng/μl)	260/280
1	355,2	1,87	15,3	2,08
2	595,5	1,88	9,3	1,87





3	1139,5	1,91	28,5	2,00
4	1271,8	1,89	8,6	2,06
5	819,0	1,90	9,6	2,06
6	1018,8	1,91	8,6	2,00
7	1675,2	1,88	27,7	1,65
8	721,3	2,03	20,2	2,35
9	901,4	1,94	12,6	1,89
10	1080,4	1,91	13,4	1,96
11	1164,3	1,91	31,2	1,73
12	1144,0	1,91	46,4	1,59
13	956,5	1,93	11,2	1,93
14	1069,3	1,93	7,8	2,14
15	1161,3	1,91	13,6	1,98
16	811,1	1,95	25,7	1,74
17	486,3	1,91	15,1	2,11
18	178,6	1,84	26,3	1,83
19	846,1	1,90	32,8	2,09
20	106,5	1,86	12,8	1,96
21	318,7	1,80	10,9	2,28
22	231,3	1,84	41,7	1,89
23	1176,8	1,86	59,9	1,90
24	151,1	1,81	17,3	2,06
25	452,6	1,86	42,8	1,50
26	417	1,89	17,8	1,67
27	94,9	1,77	16,5	2,00
28	82,4	1,89	8,4	1,78
29	161,5	1,90	10,7	1,83
30	38,0	1,81	13,5	2,55
31	92,0	1,79	19,5	1,76
32	149,6	1,92	21,3	1,77
33	128,4	1,89	14,2	1,93
34	187,1	1,81	25,3	2,52
35	160,8	1,85	22,4	1,69

Conclusões

A técnica de Salting-out forneceu concentrações de DNA muito superiores às obtidas pela técnica de Biopur, conforme visualizado na





Tabela 1. Entretanto, para a extração do DNA pela Técnica de Salting-out foram necessários 200µL de cada amostra, já pela Técnica de Biopur® foram necessários 100 µL de cada amostra. Porém, com a concentração de DNA obtida pelo Salting-out é possível diluí-lo e assim o volume final para a realização de testes e se necessário, repetições é superior ao volume final obtido pelo Biopur®. Ao analisarmos o tempo despendido para a realização da extração do DNA, nota-se que a técnica de Biopur® é muito mais rápida quando comparada ao Salting-out. Sob o aspecto financeiro, deve-se levar em conta que a técnica de Biopur é mais cara que o método de Salting-out.

Embora as concentrações obtidas pela técnica de Biopur® foram inferiores às concentrações padronizadas necessárias para genotipagem das citocinas, isso não interferiu na visualização das bandas no gel de digestão das citocinas *IL8*, *IL17*, *TNF* e *HLA-B*27*. Portanto, em se tratando de economia de tempo, a técnica de Biopur® mostrou-se vantajosa.

Agradecimentos

Agradecimentos à Fundação Araucária e ao Laboratório de Imunogenética da UEM (LIG-UEM) pelo apoio na realização desse projeto.

Referências

1. CARDOZO, D.M.; GUELSIN, G.A.; CLEMENTINO, S.L.; MELO, F.C.; BRAGA, M.A.; SOUZA, C.; MOLITERNO, R.A.; VISENTAINER, J.E.L. DNA extraction from coagulated human blood for application in genotyping techniques for human leukocyte antigen and immunoglobulin-like receptors. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 2009, 42, 651–656.
2. WANG, S.S.; THORNTON, K.; KUHN, A.M.; NADEAU, J.G. E HELLYER, T.J. Homogeneous Real-Time Detection of Single-Nucleotide Polymorphisms by Strand Displacement Amplification on the BD ProbeTec ET System. **Clin. Chem.** 2003, 49, 1599-1607.
3. PRICE, C.W.; LESLIE, D.C.; LANDERS, J.P. Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip. **Lab. Chip.** 2009, 9, 2484-2494.
4. CARPI, F.M.; DI PIETRO, F.; VINCENZETTI, S.; MIGNINI, F.; NAPOLIONI, V. Human DNA extraction methods: patents and applications. **Recent Pat DNA Gen Seq.** 2011, 5, 1-7.

