

Método rápido de extração de DNA de bactérias

Daniel Dias Rosa

Universidade Estadual Paulista – UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas – FCA, Departamento de Produção Vegetal - Setor de Defesa Fitossanitária, CP 237, CEP: 18603-970 Botucatu, SP. Bolsista do CNPq - Brasil.

Autor para correspondência: Daniel Dias Rosa. danielldr@hotmail.com

Data de chegada: 19/03/2007. Aceito para publicação em: 04/06/2008

1460

RESUMO

Rosa, D.D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.3, p.259-261, 2008

Desenvolveu-se um método rápido para extração de DNA de bactérias, que ao contrário de outros métodos, não requer o uso de enzimas, como lisozima e proteinase K, previamente, utilizado-se o carbonato de silício (carborundum) como agente físico para efetuar a quebra da parede celular da bactéria. Com este método conseguiu-se extrair DNA bacteriano num menor tempo, além de

mais rápido, ele mostrou-se mais simples e econômico, quando comparado aos métodos convencionais. O DNA obtido pode ser utilizado para diversas finalidades relacionadas ao DNA de bactérias, obtendo-se uma quantidade razoável de DNA, que varia de 725 µg/mL a 1170 µg/mL por cada 0,1 g de célula bacteriana, com ótima qualidade.

Palavras-chave adicionais: PCR, gram-positiva, gram-negativa

ABSTRACT

Rosa, D.D. A fast DNA extraction method for bacteria. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.3, p.259-261, 2008

A fast extraction method for bacteria DNA was developed. Unlike some other methods, the method does not require enzymes like lysozyme and proteinase K. Carbonate silicate (carborundum) was

used to break cell more efficiently. This method is fast, simple and more economic when compared to the previously report ones. The prepared DNA from bacteria has good quality and amount.

Additional keywords: PCR, Gram-positive, Gram-negative

A parede celular das células procarióticas sempre foi uma grande vantagem para esses organismos, pois ela apresenta diversas características como elasticidade, resistência a pressão, a altas temperaturas e a valores extremos de pH. Tais características apresentam-se como um grande desafio para a biologia molecular (1). A coloração diferencial de Gram divide as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas, sendo o grupo das Gram negativas em maior número para a fitopatologia. A reação das bactérias à técnica de Gram é relacionada diretamente à composição química, estrutural e a permeabilidade da parede celular (3). A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída de uma camada espessa composta por peptidoglicano, responsável pela sua rigidez, já nas gram-negativas, a camada de peptidoglicano é mais fina, relativamente, que consequentemente confere uma maior fragilidade (3).

Essa característica faz com que a quebra da parede celular nas gram-positivas apresente maior dificuldade, que acaba por acarretar que as técnicas utilizadas para a quebra desta parede sejam muitas vezes trabalhosas, como a ruptura celular por sonicação, auxílio de enzimas (lisozima e proteinases) tornado as técnicas mais custosa e demoradas (2).

Atualmente existe a grande necessidade de se obter técnicas baratas, rápidas e eficientes para obtenção de DNA, visto que técnicas de identificação e detecção de patógenos por PCR vêm se popularizando cada vez mais. Este trabalho teve por objetivo avaliar um método de extração de DNA pela quebra da parede celular, utilizando-se da ação mecânica, causada por carbonato de silício (Carborundum), produto

que apresenta granulometria entorno de 320 µm e é quimicamente inerte. Carborundum ou carbonato de silício é um produto abrasivo muito utilizado na fitopatologia para efetuar pequenos ferimentos, os quais viabilizam a infecção por vírus artificialmente.

Culturas bacterianas (Tabela 1) foram desenvolvidas em tubos do tipo Falcon®, contendo 10 mL de meio de cultura Nutriente Líquido (1g extrato de carne, 2g extrato de levedura, 5g peptona, 5g NaCl, 5g dextrose, 1000 mL água destilada esterilizada) por 24 horas, a 28°C, sobre agitação constante a 110 rpm. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 5000 g por 30 minutos, descartando-se o sobrenadante e obtendo-se um precipitado, o qual foi ressuspenso em 1 mL de tampão de extração (20 mM Tris pH 7.5, 25 mM EDTA, 75 mM NaCl e 1/10 volume de SDS 10%) (4). O volume obtido foi transferido para um microtubo de 1,7 mL, no qual foi acrescido de 0,2 gramas de carbonato de silício. Uma massa de 10 gramas de carbonato de silício foi previamente tratada com uma solução de 50 mL de ácido clorídrico 10M, por 2 horas a temperatura de 30°C, seguida de lavagem continua por 12 horas com água destilada, e posteriormente foi autoclavado a 120°C por 20 minutos e seco em estufa a 70°C por 24 horas. O microtubo contendo tampão de extração mais células bacterianas e o carbonato de silício foi agitado em aparelho tipo “vortex” a 2000 rpm por 2 minutos, para romper a parede celular.

Os tubos foram incubação por 30 minutos, a 50°C, após este período, acrescentou-se 2/3 do volume de NaCl 5 M e deixou-se, por 30 minutos, a 4°C. Centrifugou-os por 10 minutos, a 10.000 g, transferiu-se o sobrenadante para novos microtubos de 1,7 mL e

Tabela 1. Bactérias utilizadas, valores de razão de absorvância e concentração do DNA.

Amostra	Isolados bacterianos	Hospedeiro	Reação de Gram	Relação $\frac{Abs_{260nm}}{Abs_{280nm}}$	Concentração de DNA (mg/mL)
1	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	Feijão	+	1,65	1170
2	<i>Bacillus subtilis</i>	---	+	1,55	1090
3	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Tomateiro	-	1,72	785
4	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>passiflorae</i>	Maracujazeiro	-	1,73	1045
5	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	Tomateiro	-	1,74	735
6	<i>Escherichia coli</i>	---	-	1,64	725
7	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Tomateiro	-	1,78	1070
8	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	Tomateiro	+	1,67	1000
9	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	Rabanete	-	1,69	735
10	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	Meloeiro	-	1,73	985

adicionou-se 1 volume de clorofórmio, misturou-se vagarosamente e centrifugou-se, por 10 minutos, a 10.000g. Transferiu-se a parte aquosa obtida para um novo microtubo de 1,7 mL e adicionou-se um volume de isopropanol e incubou-o em temperatura ambiente, por 5 minutos, procedendo em seguida um centrifugação durante 10 minutos, a 10.000g, sendo descartado o sobrenadante e o precipitado obtido (DNA) foi seco à temperatura ambiente, durante 5 minutos, e então adicionou-se 40 µL de TE pH:8,0 + RNase 10µg/µL ao tubo e esse foi incubado por 60 minutos a 37°C.

Após a extração, cada amostra de DNA teve sua concentração e pureza determinadas através das leituras de absorvância em 260 nm (Concentração do DNA em µg/mL = Absx100x50) (4) e em 280 nm (quantificação de proteínas), no espectrofotômetro Ultrospec 3100 pro (Amershan Pharmacia Biotech). A razão entre as leituras em 260 nm e 280 nm foi utilizada como um indicativo da pureza do DNA obtido. A eletroforese para verificação da qualidade do DNA extraído foi realizada em gel de agarose 0,8%. A esse gel foi aplicada uma amostra de cada um dos microtubos (3 µL de água Milli-Q, 1 µL de corante azul de bromofenol e 2 µL da solução de DNA). Utilizou-se como padrão de comparação marcador Lambda (λ), nas concentrações de 100 e 200 ng/mL. Após 50 minutos em eletroforese a 90 voltz, o gel foi tratado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation), conforme instrução do fabricante, e visualizado em um aparelho transluminador com luz UV.

Procedeu-se também uma reação de polimerase em cadeia (PCR) do gene ribossomal 16S dos DNAs extraídos, o qual foi amplificado utilizando-se oligonucleotídeos universais (968 *forward*: AAC GCG AAG AAC CTT AC; 1401 *reverse*: CGG TGT GTA CAA GAC CC) (4). A PCR foi realizada utilizando 1,0 µL de DNA, 10,0 pmol de cada oligonucleotídeo, 10 mM de dNTPs, 25 mM de MgCl₂, 2,5 µL de PCR Buffer 10x e 1U de Taq DNA Polimerase (*Fermentas Life Science*) para um volume final de 25 µL. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: aquecimento inicial a 95°C, por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C, por 30 segundos, anelamento do oligonucleotídeo a 57°C, por 30 segundos, e alongamento a 72°C, por 1 minuto. Um alongamento final de 5 minutos foi realizado após os ciclos. Os produtos amplificados, de aproximadamente 430pb, foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 1%, com 5 Volts/cm, por 40 minutos. O gel foi corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen Corporation) e visualizado em um aparelho transluminador com luz UV.

Para verificar a degradação dos DNA extraído efetuou-se uma análise utilizando-se de gel de agarose 1% em eletroforese de campo pulsado, com 6 Volts/cm, ciclos de 25 por 35, por 12 horas de corrida e visualizado em um aparelho transluminador com luz UV.

Na análise do DNA por espectrofotometria mostrou uma boa qualidade deste. Baseado nos valores da razão da absorvância de 260nm/280nm mostrou que o DNA obtido estava de boa qualidade e com baixas concentrações de proteínas e de RNA (Tabela 1). A análise da extração do DNA em gel de agarose mostrou que a quantidade de quebra de DNA foi pequena, obtendo-se uma banda bem visível com pouco sinal de degradação (Figura 1A) e com boa quantidade extraída (Tabela 1) quando efetuada a análise quantitativa do DNA em relação ao marcador λ.

A quantificação por espectrofotometria mostrou que as concentrações dos DNAs extraídos variaram de 785 µg/mL a 1170 mg/mL (Tabela 1). Na estimativa de rendimento da extração, relativa a uma massa de célula bacteriana de 0,1 grama, de células de *E. coli*, obteve-se uma concentração de 725 µg/mL, que representa um rendimento de 29µg de DNA, ou seja, 290 µg de DNA/g de célula de *E. coli* (Figura 1; Tabela 1A).

A análise para verificar a integridade do DNA utilizou-se a reação de PCR, com os oligonucleotídeos amplificadores da região do 16S rDNA, obtendo-se um fragmento de 430 pares de base, esta amplificação mostrou que o DNA está íntegro, confiável para estudos utilizando-se de PCR a partir de DNA extraído por este método (Figura 1B).

Para comprovar a possibilidade da utilização do DNA extraído, por este método, para técnicas mais refinadas, como clonagem de grandes fragmentos de DNA em vetores do tipo BAC (*Bacterial Artificial Chromosomal*), efetuou-se a análise dos DNAs extraídos em eletroforese de campo pulsado por 11 horas, que mostrou uma fragmentação do DNA aceitável, apresentando fragmentos que variaram de 48.500 pares de base a 291.000 pares de base, mostrando assim que é viável a utilização desta técnica para construção de BACs (Dados não apresentados).

O método de extração utilizando carbonato de silício como ferramenta para romper a parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas, visando a extração de DNA, mostrou-se eficiente, apresentando resultados satisfatórios quando comparados com os métodos descritos na literatura (2) e de baixo custo, quando comparado com os métodos tradicionais (2).

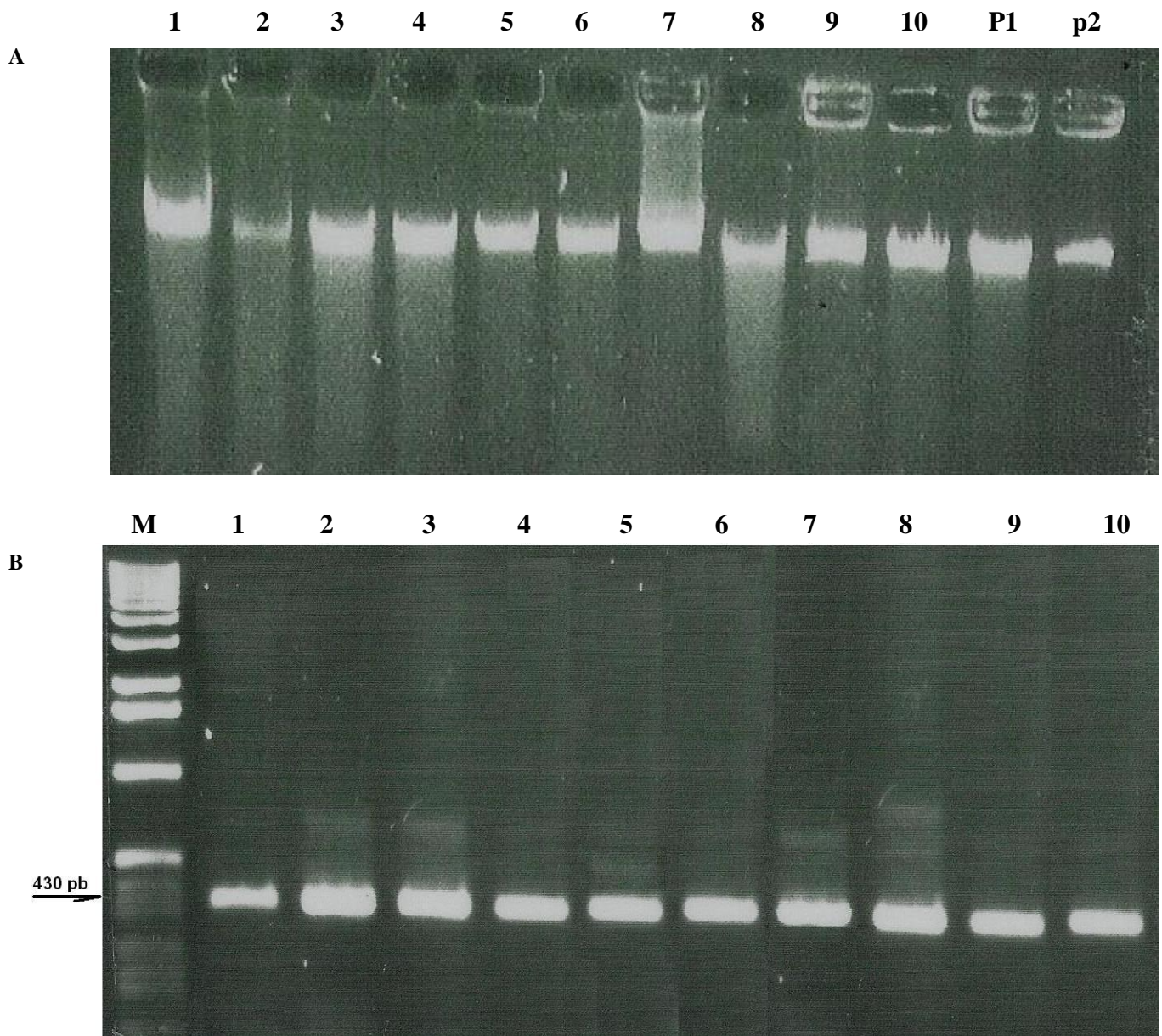


Figura 1. A) Quantificação do DNA em gel de agarose 0,8%; P1 Marcador Lambda, 200 ng/mL; P2. Marcador Lambda 100 ng/mL; 1. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*; 2. *Bacillus subtilis*; 3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*; 4. *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae*; 5. *Xanthomonas vesicatoria*; 6. *Escherichia coli*; 7. *Ralstonia solanacearum*; 8. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; 9. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; 10. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* A1. **B)** Gel de agarose 1%, produtos da reação de PCR com os oligonucleotídeos da região do gene 16S rDNA, amplificando um produto de 430 pb, M. marcador de peso molecular 1 Kpb.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beveridge, T.J. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 181, n. 16, p. 4725-4733, 1999.
2. Nogueira, C.A.M.; Momesso, C.A.S.; Machado, R.L.D.; Almeida, M.T.G de.; Rossit, A.R.B. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 35-38, abr-jun, 2004.
3. Salton M.R.J. Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Biochim. et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 10, n.4, p.512-523, 1953
4. Sambrook, J., Fritschi, E.F e Maniatis, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.720.