

UTILIZAÇÃO DE PROTOCOLO “*IN HOUSE*” PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *LORICARIICHTHYS ANUS*

PAULO LEONARDO SILVA OLIVEIRA¹; DAIANE MACHADO SOUZA²; SUZANE FONSECA FREITAS² RODRIGO RIBEIRO BEZERRA OLIVEIRA¹; SÉRGIO RENATO NOGUEZ PIEDRAS³; JUVÊNCIO LUIS OSÓRIO FERNANDES POUEY³

¹Acadêmico de Agronomia – Laboratório de Ictiologia UFPel – leonardooliveira_92@hotmail.com

²Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Zootecnia – Laboratório de Ictiologia UFPel

³Professor Programa de Pós Graduação em Zootecnia – Laboratório de Ictiologia-juvencio@ufpel.tche.br

1. INTRODUÇÃO

Apesar da grande diversidade de espécies de peixes e da sua grande importância econômica comercial para o homem, ainda pouco se conhece sobre suas características biológicas, ecológicas e genéticas (RESENDE et al. 2006). A falta de conhecimento das espécies e consequentemente a falta de manejo destas, além das altas taxas de pesca são os principais responsáveis da perda de diversidade e reduções drásticas nas populações (NASCIMENTO et al. 2001; ALBUQUERQUE et al. 2002; PETRERE et al. 2004). Por isso torna-se necessário conhecer a fundo nossa biodiversidade, especialmente quando se trata de espécies nativas, e espécies que possuem um grande potencial econômico.

O DNA é a matéria prima para qualquer conhecimento de genética básica, segundo SOLLERO et al. (2004). Pesquisas sobre metodologias específicas que otimizem a extração de um DNA de boa qualidade da amostra, para que assim, as regiões desejadas sejam localizadas e amplificadas, gerando desenvolvimento no ramo da pesquisa de biologia molecular.

O uso do protocolo “*in house*” é um meio econômico de realizar extrações de DNA genômico, já que o “kit” comercial para a mesma finalidade torna-se muitas vezes inviável economicamente, neste sentido, o objetivo do presente estudo é avaliar os resultados gerados a partir do uso do protocolo “*in house*” nas extrações de DNA em amostras de fragmento da nadadeira caudal e de músculo de *L. anus*.

2. METODOLOGIA

O material biológico foi coletado através de pescadores artesanais, licenciados pelo IBAMA, que atuam na Lagoa Mangueira, no município de Santa Vitória do Palmar e na Lagoa Mirim, localizada no município de Jaguarão, ambas do extremo sul do Rio Grande do Sul.

Foram amostrados 19 peixes de cada lagoa, totalizando 38 indivíduos. O material biológico coletado para análise genética consistiu em uma amostra de músculo e fragmento da nadadeira caudal (aproximadamente 200–300mg) de cada animal coletado, os quais foram armazenados em etanol 95% e preservados a -20°C para extração de DNA genômico no Laboratório de Genética Animal (LEGA) pertencente ao Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética (DEZG) do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

O DNA genômico total, foi extraído usando separação orgânica pelo protocolo “*in house*” de Cloreto de Sódio proposto por BARRERO et al., 2008 com modificações, que consiste:

- Maceração do tecido muscular, objetivando a ruptura da parede e membranas celulares, promovendo assim a liberação da molécula de DNA;
- Adição de 600 µL de solução tampão TNE1 (5 ml de tris HCl 1 Molar, pH 8.0, 10 ml de EDTA, 1ml de NaCl,), tendo por finalidade promover a lise das células, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade;
- Adição de 330 µL de TNE2 (5ml tris HCl 1 Molar pH 8,0; 10 ml EDTA, 1ml NaCl; 10 ml SDS 20%), como solução detergente para solubilização das membranas e auxiliando na inativação de enzimas;
- 4 µL de proteinase K para a desnaturação proteica e incubação imediata à 50°C “overnight”;
- Após a incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares foram adicionados 340 µL de NaCl 5M;
- O material foi centrifugado a 12000 rpm e transferido o sobrenadante para novos microtubos, onde foram acrescidos 900µL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA;
- Posteriormente, foi realizada a lavagem do material com 200 µL de etanol 70%.
- Por fim, o DNA foi ressuspenso com 100 µL de água milli-q.

Para checagem da integridade do DNA obtido, as amostras foram submetidas a eletroforese horizontal com gel de agarose 1% e tampão SB1X durante 30 minutos a 120 volts. Para tal, foi usada uma alíquota de 7 µL de DNA sendo o mesmo corado com 1.1 µL de *GeiRed* (Biotium, USA) e 2 µL de Ladder 100pb (Ludwig Biotec) posteriormente visualizados em transiluminador UV e registrados digitalmente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através do uso do protocolo “*in house*” foi possível extrair DNA genômico de todos os 38 exemplares de *L. Anus* independente do material da fonte de material biológico amostrada. A presença da banda fluorescente no gel, significa a presença de DNA, como mostra a FIGURA 1.

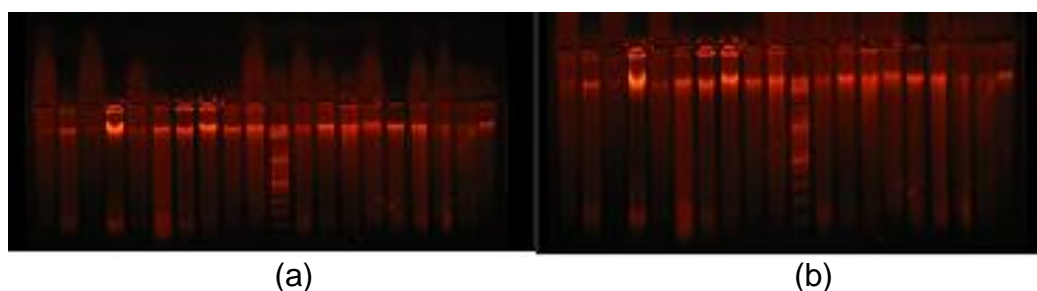


FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo extrações de DNA genômico a partir de tecido muscular (a) e nadadeira caudal (b) de *L. anus* oriundos dos dois locais de estudo

Segundo MARENGONI et al. (2006), vários procedimentos de extração de DNA têm sido descritos na literatura, utilizando métodos padrões com algumas modificações, visando solucionar os problemas específicos da espécie em estudo. Para a obtenção de um DNA com qualidade adequada e com boa concentração, é importante lembrar que a forma de coleta e a conservação do tecido são muito importantes (SOLLERO et al. 2004).

A pureza do DNA é afetada significativamente pela condição do tecido anteriormente à extração e por esse motivo, recomenda-se utilizar o material mais fresco possível (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). No atual estudo, apesar das amostras terem sido coletadas, mantidas em etanol 95% e armazenadas à temperatura de -20°C, por uma semana, a qualidade dos tecidos se mantiveram.

4. CONCLUSÕES

O protocolo “*in house*” mostrou-se eficiente na extração do DNA genômico da espécie de estudo, independentemente do material biológico utilizado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, S.P.; CAMPOS, F.L.R.; CATELLA, A.C. **Sistema de Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul SCPECA/MS** – 9. Boletim 31 de Pesquisa e Desenvolvimento: Embrapa Pantanal, Corumbá, 2002.

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v.35, n.1, p. 65-74, 2008.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN. 220p.

MARENGONI, N. G.; MACHADO, M. R. F.; GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. Seminário: **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2006

NASCIMENTO, F.L.; CATELLA, A.C.; MORAES, A.S. **Distribuição Espacial do Tucunaré, Cichla sp. (Pisces, Cichlidae), peixe amazônico introduzido no Pantanal, Brasil**. Boletim 24 de Pesquisa e Desenvolvimento. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2001.

PETREIRE JR., M.; BARTHEM, R.B.; CÓRDOBA, E.A.; GÓMEZ, B.C. Review of the large catfish fisheries in the upper Amazon and the stock depletion of piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein). In: HART, P. J. B.; PICHER, T. J. (eds.). **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 2004. p.403-414.

RESENDE, E.K.; HILSDORF, A.W.S.; MARQUES, D.K.S. **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas**. Embrapa Pantanal. Corumbá, MS, 2006.

SOLLERO, B.P.; FARIA, D.A.; PAIVA, S.R.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PAIXÃO, D.M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: **CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA, 6., Congresso nacional de Zootecnia**, 13., Brasília, 2004. Brasília. **Anais...Brasília**: SBZ, 2004. CD-ROM.