

TRATAMENTO PARA AUMENTAR A QUALIDADE DE AMOSTRAS DE DNA METAGENÔMICO EXTRAÍDO DO SOLO

Luiz Henrique Machado Oliveira¹; Jamile Brazão Lima e Silva²; Felipe Ferreira da Silva³; João Ronaldo Tavares de Vasconcelos Neto⁴; Elisa Esposito⁵

¹Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-Mail: henriquebiomol@gmail.com

²Bolsista PIBIC/FAPESB, Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-Mail: jamile_brazao@hotmail.com

³Bolsista PIBIC/FAPESB Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-Mail: felipefsdev@gmail.com

⁴Co-orientador, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-Mail: jrtvasconcelosneto@gmail.com

⁵Orientadora, Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal de São Paulo, e-Mail: eesposito@unifesp.br

PALAVRAS-CHAVE: Extração de DNA, Preservação, Quantificação.

INTRODUÇÃO

O solo é um dos habitats mais complexos e microbiodiversos conhecidos, porém a sua estrutura e composição biológica é pouco conhecida. Estima-se que apenas 1% da microbiota do solo pode ser estudada tendo como base os métodos clássicos de cultivo e isolamento. Para sanar essa deficiência a Metagenômica tem sido usada para acessar o código genético de microrganismos até então desconhecidos (Daniel, 2005).

Todos os projetos envolvendo a Metagenômica apresentam nas etapas iniciais a Extração do DNA que será posteriormente sequenciado. Entretanto, a matriz complexa do solo contém substâncias químicas que prejudicam a preservação das amostras e a extração adequada dos ácidos nucleicos. Além disso, os processos de coleta, transporte e armazenamento das amostras modificam a estrutura física das partículas do solo e alteram as condições de temperatura, umidade e pH. Por isso, é de extrema importância iniciar a extração do DNA metagenômico o mais rápido possível, para que não haja alterações significativas das comunidades bacterianas antes da obtenção de seus respectivos ácidos nucleicos. Sendo assim, é essencial a realização de uma metodologia adequada para a obtenção de amostras de DNA que atendam aos requisitos exigidos por cada plataforma para a realização do sequenciamento (Handelsman, 2004; Thomas et al, 2012; Cáceres et al, 2012).

Este trabalho objetivou o aperfeiçoamento da metodologia de coleta, preservação e extração de DNA Metagenômico de alta qualidade voltado ao sequenciamento em plataformas de Nova Geração ou “Next Generation Sequencing” (NGS).

METODOLOGIA

Coleta de solo

Para aprimorar a metodologia de coleta para os trabalhos envolvendo os microrganismos do solo, o mesmo foi coletado entre 10 e 20 cm de profundidade. Cada uma das 32 amostras pesadas em campo continha 0,5g, que foram acondicionadas individualmente em microtubos de 2,0 ml. Sendo submetidos a dois tratamentos diferentes. No tratamento 1, foram utilizados 16 tubos contendo apenas o solo. No tratamento 2, foram utilizados 16 tubos contendo o solo e ainda 500 µl de CTAB Buffer (5% CTAB; 100 mM TrisHCl [pH=8]; 20 mM EDTA; 1.4 M NaCl; 0.5% β-mercaptoethanol). Os microtubos do tratamento 2 foram homogeneizados no agitador de tubos com agitação constante de 10 segundos. Em seguida todos os microtubos foram imediatamente armazenados em gelo e levados ao laboratório, onde foram armazenados à 4 °C por 72 horas.

Extração de DNA

Para a extração do DNA do solo foi utilizado o protocolo Doyle & Doyle (1987) modificado. Após a extração, foi realizada a determinação da concentração e da pureza das amostras de DNA no espectrofotômetro NanoDrop Thermo Scientific 2000. O tratamento (1 ou 2) que apresentou o melhor resultado foi usado para a coleta de novas amostras, visando seguir com as demais atividades.

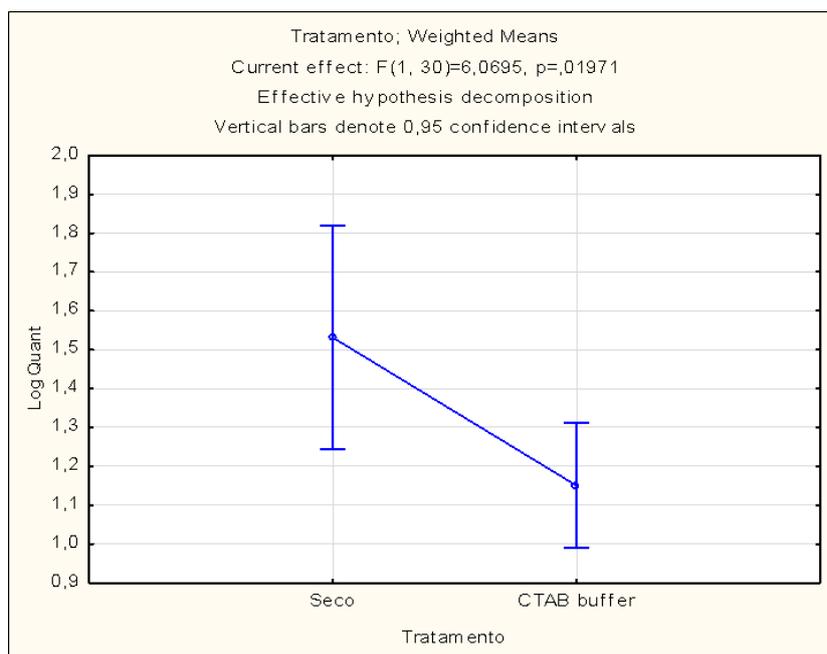
Amplificação e Purificação do DNA

As amostras de DNA foram submetidas a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para amplificar o gene 16S utilizando-se os primers R1378 e F343. O produto da PCR foi purificado com PEG 6000 (Polietilenoglicol) para remover todo o conteúdo não necessário ao sequenciamento. Após a amplificação as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose à 1% e registradas com o Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX e do Software L-Pix Image (Loccus Biotecnologia), para diagnosticar a eficiência da amplificação e sua viabilidade para o sequenciamento.

RESULTADOS

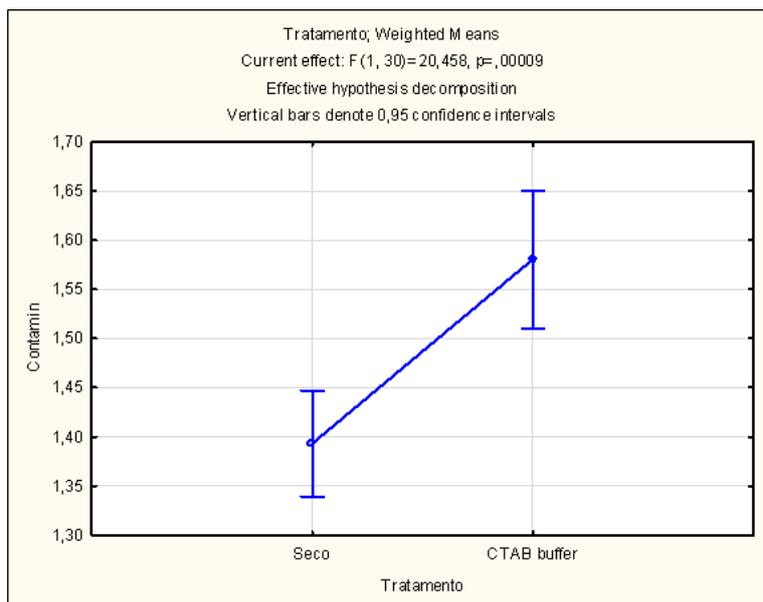
Através da Análise de Variância (ANOVA) verificou-se que – em relação à concentração de DNA – não houve diferença estatística entre os Tratamentos I e II testados na Etapa I da Coleta de Solo, entretanto houve maior uniformidade entre as amostras do tratamento 2 (Gráfico 1).

Gráfico 1: Log da concentração de DNA em relação ao tratamento de Conservação. Tratamento 1 (solo seco) e Tratamento 2 (CTAB Buffer).



Em relação à pureza do DNA (Gráfico 2), observa-se claramente que as amostras do tratamento 2 apresentam maior pureza. Através da Análise da imagem obtida do gel de agarose, observa-se que as amostras do tratamento 2 apresentaram maior nitidez e menos arrasto. Desta forma, podemos afirmar que o tratamento 2 é mais eficiente para a preservação de amostras de solo para a análise do seu Metagenôma.

Gráfico 2: Pureza do DNA (260/280) em relação ao tratamento de Conservação. Tratamento 1 (Seco) e Tratamento 2 (CTAB Buffer).



O protocolo Doyle & Doyle (1987) modificado mostrou-se satisfatório para a execução deste estudo, porém, para a obtenção de amostras com qualidade superior é altamente recomendável a utilização do protocolo descrito por Sagova-Mareckova (2008).

Podemos atribuir a eficiência do Tratamento II aos componentes do “CTAB Buffer” utilizado na preservação e extração das amostras de solo. O Tris-HCl [pH=8] é uma solução tampão capaz de prevenir variações súbitas no pH da amostras que podem degradar o material genético antes de sua extração. Além disso o β -mercaptoethanol age como antioxidante também prevenindo a degradação das amostras coletadas (REBOUÇAS, 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir da utilização do tratamento II pode-se obter o DNA de alta qualidade nas condições ideais para o NGS, aumentando a pureza do material genético e reduzindo a interferência da degradação das amostras na obtenção de sequências raras no metagenoma. Em complemento ao Tratamento II, deve-se adaptar o protocolo de extração de DNA de acordo com as características físico-químicas do solo de interesse (Sagova-Mareckova, 2008). Sem o protocolo de extração adequado, as amostras podem não atender aos requisitos mínimos para o NGS (KNAPP & HOFREITER, 2010)

REFERÊNCIAS

BOBADILLA, C.; BRAVO, C.; CALIGARI, P.; CARRASCO, B; GARCÍA-GONZALES, R. 2012. Efficient protocols for the extraction of microbial DNA from the rhizosphere of hidrofílic forests in Chile. *Cien Inv Agr.* 39(3): 585-592.

DANIEL, R..The Metagenomics of Soil. *Nature Reviews Microbiology.* 2005. (3). p 470-478.

HANDELSMAN, J. 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 68(4): 669-685.

KNAPP, M.; HOFREITER, M..2010. Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives. *Genes.* 1(2):227-243

REBOUÇAS, N.A. *Biologia Molecular Aplicada à Medicina: Fundamentos Teóricos e Metodológicos*. Disponível em: <http://www.i2bio.org/wp-content/uploads/biologia-molecular-aplicada-%c3%80-medicina-fundamentos-te%c3%93ricos-e-metodol%c3%93gicioas.pdf>.

Acessado em: 10/08/2013.

SAGOVA-MARECKOVA, M. et. al. 2008. Innovative Methods for Soil DNA Purification Tested in Soils with Widely Differing Characteristics. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(9): 2902-2907.

TOMAS, T; GILBERT J.; MEYER, F. 2012. *Metagenomics – a guide from sampling to data analysis. Microbial Informatics Experimentation*. Disponível em: <http://www.microbialinformaticsj.com/content/2/1/3>. Acessado em: 30/06/2013.