



# Nº 221 – OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE SEMENTES DE FEIJÃO PARA SEQUENCIAMENTO

Tayara Colins Nunes<sup>1</sup>; Alisson F. Dantas<sup>1</sup>; Marcos A. Gimenes<sup>1</sup>; Marília de Castro Rodrigues Pappas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. \*E-mail do autor apresentador: marília.pappas@embrapa.br.

## OBJETIVO

Obter RNA total de alta qualidade e pureza a partir de sementes para uso em sequenciamento massal de RNA no âmbito do projeto “Integridade de RNA em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) conservadas em longo prazo como marcador do envelhecimento em nível molecular”.

## MATERIAL E MÉTODOS

- Foram testados três diferentes kits/protocolos de isolamento de RNA total: 1- Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (BioRad); 2- reagente a base de fenol PureLink™ Plant RNA Reagent (ThermoFisher) com purificação após isolamento usando a filtração em coluna RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen); 3- Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit (BioRad) com o reagente a base de fenol PureLink™.

- A quantificação e a avaliação da pureza do RNA foram obtidos a partir de dados de densidade óptica obtidas por espectrofotometria realizada em Nanodrop (ThermoFisher).

- Para análise da integridade do RNA, as amostras foram submetidas a eletroforese de alta performance no equipamento Bioanalyzer e usado o índice RIN (do inglês, número de integridade de RNA).

## RESULTADO

**S** - A primeira metodologia testada não foi eficiente nem para rendimento nem pureza do RNA com relação a polissacarídeos (inferida pela razão A260/230). A segunda não foi eficiente para a pureza com relação a polissacarídeos (Tabela 1).

- O isolamento de RNA a partir de 95-98 mg de sementes pulverizadas em cadinho com nitrogênio líquido, usando uma combinação do reagente a base de fenol, PureLink™ Plant RNA Reagent, com o kit Aurum™ (BioRad), foi a abordagem mais eficiente tanto em termos de pureza do RNA quanto de rendimento suficiente para as aplicações previstas.

- A análise de integridade de RNA isolado pelas três metodologias não apresentaram diferenças entre si (Figura 1).

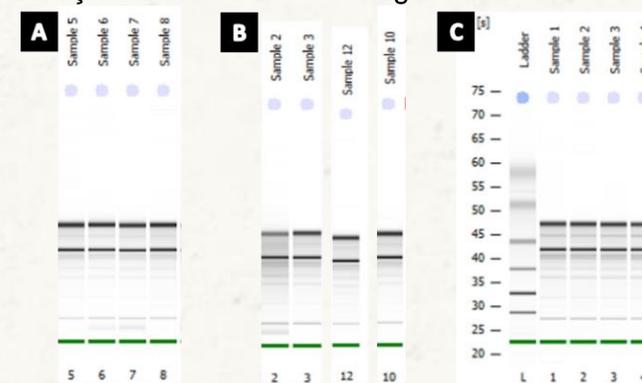
Metodologia	n	Concentração RNA (ng/µl)	260/280	260/230
1	4	5,7±1,7	1,7±0,1	0,3±0,1
2	4	717,7±398,7	2,1±0,03	1,5±0,8
3	4	442,8±106,0	2,1±0,04	2,2±0,1

**Tabela 1:** Médias das concentrações e índices de pureza (260/280; 260/230) de RNA obtidas a partir de leitura em espectrofotômetro Nanodrop. n= número de amostras.

## CONCLUSÃO

- As razões dos valores de densidade óptica obtida por espectrofotometria usadas para avaliação da pureza com relação a proteínas e polissacarídeos (260/280 e 260/230, respectivamente), apresentaram valores em torno de 2,0, valor considerado ideal para este parâmetro.

- Os valores do RIN não diferiram entre as metodologias utilizadas, ou seja, o método de extração não interferiu na integridade do RNA isolado.



**Figura 1:** Imagem simulada de gel de RNA a partir de eletroforese de alta performance em Agilent Bioanalyzer 2100. A- metodologia 1; B- metodologia 2; C- metodologia 3.

## AGRADECIMENTOS

Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal