

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE RNA DE SEMENTES DE FEIJÃO PARA SEQUENCIAMENTO

Tayara Colins¹; Alisson Dantas¹; Marcos A. Gimenes¹; Marília Pappas¹

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

A extração de ácidos nucleicos a partir de sementes é dificultada pela natureza deste material vegetal. Por se tratar de tecido de reserva, onde polissacarídeos são as moléculas predominantes, o isolamento de ácido nucleico puro, seja DNA ou RNA, é uma tarefa desafiadora. A contaminação com polissacarídeos representa um problema para várias aplicações de ácidos nucleicos, especialmente aquelas dependentes de digestão com enzimas e amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*), como o preparo de bibliotecas para sequenciamento de segunda geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*). Com o objetivo de 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”, testamos 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™. Os resultados mostram que extração com as duas primeiras metodologias testadas não foram eficientes para rendimento nem para a obtenção de RNA puro de sementes com relação a polissacarídeos, conforme inferido por dados de razão das densidades ópticas a 260 e 230 nm obtidas por espectrofotometria realizada em Nanodrop (Thermofisher). O isolamento de 95-98 mg de sementes pulverizadas em cadinho com nitrogênio líquido, usando uma combinação do PureLink™ Plant RNA Reagent com o kit Aurum™ (BioRad), foi a abordagem mais eficiente tanto em termos de rendimento quanto de pureza de RNA. Ambas as razões de densidade óptica geradas 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.

Palavras-chave: extração de RNA; germoplasma semente; conservação

Agradecimentos: Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal