

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

HUDSON MARQUES PAULA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE
RNA DE CÉLULAS EM CULTURA LIVRE DE FENOL**

SÃO GABRIEL

2017

HUDSON MARQUES PAULA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE
RNA DE CÉLULAS EM CULTURA LIVRE DE FENOL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de graduação em biotecnologia da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Andrés Delgado Cañedo

SÃO GABRIEL

2017

HUDSON MARQUES PAULA COSTA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE
RNA DE CÉLULAS EM CULTURA LIVRE DE FENOL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de graduação em biotecnologia da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em 13 de novembro de 2017.

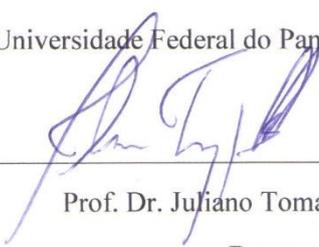
Banca examinadora:



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador

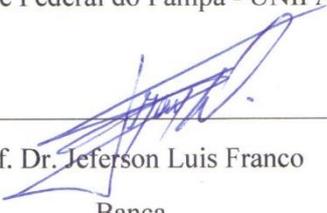
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA



Prof. Dr. Juliano Tomazzoni Boldo

Banca

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Jeferson Luis Franco

Banca

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus familiares que sempre me apoiaram e aos amigos que conquistei nos últimos 4 anos que compartilharam comigo grandes momentos durante esse período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e capacidade de entendimento que ele tem me proporcionado.

Agradeço pelo apoio incondicional que meus pais, Vicente de Paula Filho e Claudimar Aparecida Costa, e meu irmão, Alisson Marques Paula Costa, tem me proporcionado com muito amor e carinho.

Gostaria de agradecer meu orientador Andrés Delgado Cañedo não só pelas orientações acadêmicas e confiança em mim depositadas, mas também pela convivência extraclasse como amigo e conselheiro de “coisas da vida”. Agradeço também pela parceria de degustações de méis, vinhos e cervejas em eventos e sociais.

Agradeço o companheirismo e profissionalismo dos meus amigos de laboratório e um agradecimento especial ao técnico Adriano, à mestre Viviane, e minha amiga Josiely por toda ajuda laboratorial e experiências extraclasse.

Agradeço a família Pinto que me acolheu durante esses anos e me tratou como sendo parte da família.

Agradeço também aos meus amigos que, assim como os citados anteriormente, fizeram a minha vida mais feliz durante esses 4 anos de caminhada. Pelos momentos de alegrias, tristezas, experiências e momentos intensos vividos. Aos que ficaram sob meus cuidados e cuidaram de mim dentro de casa: Gleison, Filipe, Adrine, Igor e Marlon. Às futuras biólogas e aos futuros biotecnologistas: Renata, Caroline, Jéssica, Michele, Amanda, Carlos e Lucas. Aos integrantes do “Perceba, Ivair!”: Dennis, Helber, Anderson, Rafael, Bárbara, Jaqueline, Luiza, Natália Oliveira, Tainara, Kimberli, Vitória e Pablo. Ao meu casal favorito: Mateus e Beatriz. Aos que se transferiram para outra universidade: Juan e Ana Victória. Aos que gostam de uma farra: Diego, Marcos Paulo (França) e Alexandre.

Agradeço a todos os professores e colegas de classe que cooperaram para minha formação.

Deixo aqui meus agradecimentos a cada um de vocês por fazerem parte da minha história. Obrigado!

“Se fosse fácil achar o caminho das pedras,
tantas pedras no caminho não seriam ruim”.

Humberto Gessinger

RESUMO

O ácido ribonucleico (RNA) é um polímero de ribonucleotídeos encontrado no interior de células tanto eucarióticas como procarióticas e está quase sempre relacionado à expressão gênica. Para se obter resultados confiáveis em estudos de expressão gênica, é necessário extrair um RNA puro e íntegro. Técnicas para extração de RNA de alta qualidade vem sendo desenvolvidas e refinadas e as mais utilizadas atualmente são as de colunas cromatográfica de sílica presentes em kits comerciais e a técnica de tiocianato de guanidina – fenol – clorofórmio, utilizada em reagentes como o Trizol comercializado pela Thermofisher ou o TRI Reagent comercializado pela Sigma-Aldrich, entre outros. As duas técnicas extraem um RNA de alta pureza e qualidade. No entanto, solventes orgânicos como o fenol são tóxicos e interferem negativamente na quantificação do RNA por absorver luz UV no mesmo comprimento de onda do RNA. Colunas cromatográficas limitam a extração de RNA à quantidade que cada uma suporta além de tornar um método de alto custo quando se tem um grande número de amostras. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de baixo custo de extração de RNA de alta qualidade a partir de células em cultura dispensando o uso do sistema orgânico Fenol-Clorofórmio. O RNA foi extraído de células K562 (entre 1 e 3 x 10⁶ células por reação) cultivadas em meio RPMI 1640, seguindo procedimento padrão. As células foram separadas do meio de cultura por centrifugação e ressuspendidas em uma solução tampão (pH 7,8) contendo 140 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de TRIS. As células foram fracionadas em tubos de reação de 1,5 mL e lisadas adicionando 0,2 volumes de DTT 2 M e 0,1 volume de solução de NP-40 (10% v/v) em vortex. Os núcleos foram removidos por centrifugação e o sobrenadante contendo o RNA foi submetido a desnaturação proteica com tiocianato de guanidina na concentração final de 1 M. Posteriormente, um processo de purificação do RNA foi realizado por *salting out* com sulfato de amônio na concentração final de 1 M. Finalmente, o RNA foi precipitado em 0,1 volume de acetato de sódio e 0,6 volumes de isopropanol a -20 °C, o precipitado foi lavado com isopropanol 50 % e eluído em água ultrapura. Como controle foi utilizado RNA extraído por colunas cromatográficas de kit comercial seguindo orientações do fabricante. As extrações foram realizadas no mesmo dia com a mesma quantidade de células e nas mesmas condições. Foram realizadas análises de eletroforese em gel de agarose não desnaturante, quantificação de proteínas por Bradford, RT-PCR e qRT-PCR para avaliar o RNA extraído pelo método TGSA (tiocianato de guanidina – sulfato de amônio; descrito neste trabalho) em comparação com o RNA extraído por coluna cromatográfica. As análises

demonstraram que o método TGSA permite extrair RNA de alta qualidade com características similares às apresentadas pelo RNA extraído com colunas cromatográficas. Além disso, foram feitos orçamentos de reagentes necessários para extração de RNA com método TGSA e um comparativo de preços com os kits comerciais. O método de TGSA custou R\$ 1,61 por reação com reagentes de vários fornecedores e R\$ 2,66 por reação com todos os reagentes da empresa Sigma Aldrich. Isso representa um valor aproximadamente 8,4 vezes inferior ao necessário para realizar a extração de RNA de alta qualidade com o método de menor custo na presente data (PureLink RNA mini kit – Thermo Fishier).

Palavras-chave: Tiocianato de guanidina. Sulfato de amônio. *Salting out*. cDNA. qRT-PCR

ABSTRACT

Ribonucleic acid (RNA) is a polymer of ribonucleotides found within prokaryotic and eukaryotic cells and it's almost always related to gene expression. To get trustworthy results in gene expression research, extract a high purity and integrity RNA is necessary. Many techniques to isolate a high-quality RNA has been developed and improved and the most utilized nowadays are silica chromatography columns present in commercial kits and guanidinium thiocyanate - phenol – chloroform extraction technique, used in reagents such as Trizol marketed by Thermofisher or TRI Reagent marketed by Sigma - Aldrich, among others. Both techniques isolate a high purity and quality RNA. However, organic solvents like phenol are very toxic and interfere negatively in RNA quantification by absorbing UV in the same wavelength than RNA. Chromatography columns limits RNA extraction to the amount of each column can support and become an expensive method in experiments with a large number of samples. The objective of this work was developing an inexpensive protocol for a high-quality RNA isolation from cultured cells dispensing the use of organic system phenol-chloroform. RNA was isolated from k562 cultured cells (between 1 and 3×10^6 cells per reaction) in RPMI 1640 medium following standard procedure. Cells were separated from the culture medium by centrifugation and resuspended in a buffer solution (pH 7.8) containing 140 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM TRIS. The cells were fractionated in 1.5 mL reaction tubes and lysed by adding 0.2 volumes of 2 M DTT and 0.1 volume of NP-40 solution (10% v / v) and vortexing. The nuclei were removed by centrifugation and the supernatant containing the RNA was subjected to protein denaturation with guanidine thiocyanate at the final concentration of 1 M. The purification of RNA was performed by salting out with ammonium sulfate at the final concentration of 1 M. The RNA was precipitated with 0.1 volume of sodium acetate and 0.6 volumes of isopropanol at -20 ° C. The precipitated was washed with 50% isopropanol and eluted in ultrapure water. As control, RNA was extracted by columns with commercial kit following manufacturer's instructions. Extractions were performed on the same day with the same number of cells under the same conditions. Non-denaturing agarose gel Electrophoresis, Bradford, RT-PCR and qRT-PCR analyses were performed to evaluate the RNA extracted by the TGSA (guanidine thiocyanate - ammonium sulfate, described in this work) in comparison to RNA extracted from the chromatographic column. The analysis showed that the TGSA method allows the extraction of high-quality RNA with characteristics similar to those presented by the RNA extracted with chromatographic columns. In addition, required reagents

budget for RNA isolation with TGSA method was made and a comparison of prices with commercial kits also. The TGSA method cost R\$ 1.61 per reaction with reagents from several suppliers and R \$ 2.66 per reaction with all reagents from Sigma Aldrich. This represents a value approximately 8.4 times lower than that required to perform the extraction of high quality RNA with the cheaper method (PureLink RNA mini kit - Thermo Fishier).

Keywords: guanidinium thiocyanate, ammonium sulfate, salting out, cDNA, qRT-PCR

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Esquema geral do método tiocianato de guanidina-sulfato de amônio (TGSA) 22
- Figura 2 - Efeito da concentração do tiocianato de guanidina nas extrações de RNA. Primeiro poço à esquerda não contém guanidina (-). Os demais poços contêm guanidina nas concentrações indicadas. 27
- Figura 3 - Efeito das concentrações do sulfato de amônio sobre RNA purificado por coluna. O primeiro poço não contém sulfato de amônio (-). Demais poços contêm sulfato de amônio nas concentrações indicadas na figura..... 28
- Figura 4 - Comparação entre duplicatas de extrações com TGSA e coluna cromatográfica em gel de agarose 1,5 % não desnaturante. Foram carregados aproximadamente 1,7 µg de RNA por poço. As setas indicam os RNAs ribossomais 28 S e 18 S. Os poços 1 e 2 são as duplicatas do método TGSA e os poços 3 e 4 são as duplicatas do método de coluna. 30
- Figura 5 – Análise da concentração e pureza de amostras representativas de RNA extraído pelo método TGSA ou por coluna cromatográfica. (A) mostra a curva de absorvância do RNA extraído com o método TGSA e (B) mostra a curva de absorvância do método de coluna. (C) indica a relação de absorvância A260/A280 e A260/A230 do método TGSA e (D) indica a relação de absorvância A260/A280 e A260/A230 do método de coluna cromatográfica. 31
- Figura 6 - Propriedades do RNA extraído pelo método de TGSA após otimização total do mesmo apresentando quantificação e análise de pureza (A). Parâmetros de calibração de curva de albumina padrão (B). Quantificação das proteínas da amostra de RNA (Painel C). 34
- Figura 7 – Imagem de gel de agarose mostrando a amplificação de cDNA do gene β – actina (A) e a amplificação do cDNA do gene GAPDH (B); M = marcador de peso molecular 100 pb. O poço (-) é o controle negativo. Os poços 1 e 2 são amplificações com RNA extraído pelo método de TGSA e os poços 3, 4 e 5 são amplificações com RNA extraído pelo método de coluna. 35
- Figura 8 - Comparação da amplificação do cDNA proveniente da técnica TGSA e coluna cromatográfica com primers específicos para o gene GAPDH. Em todos os casos o cDNA foi sintetizado a partir da mesma quantidade de RNA. 36
- Figura 9 - Comparação da amplificação do cDNA proveniente da técnica TGSA e coluna cromatográfica com primers específicos para o gene β -actina. Em todos os casos o cDNA foi sintetizado a partir da mesma quantidade de RNA. 36
- Figura 10 – Eletroforese da extração de RNA de *Danio rerio*. Poços 1 – 4 são extrações de estágio larval de 72 horas; os poços 5 e 6 são extrações de 1 cérebro por extração e os poços 7 e 8 são extrações de 2 cérebros por extração (estágio adulto) 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito de diferentes concentrações de sulfato de amônio na Presença ou ausência de proteínas no RNA purificado.....	29
Tabela 2 - Orçamento dos reagentes Sigma (EUA) para extração de RNA com método TGSA.	37
Tabela 3 - Orçamento dos reagentes Sigma (BR) para extração de RNA com método TGSA.	38
Tabela 4 - Comparação de preços, em dólares, entre TGSA e kits comerciais.....	39
Tabela 5 - Comparação de preços, em reais, entre TGSA e kits comerciais.....	40
Tabela 6 - Orçamento dos reagentes de diferentes fabricantes	41

LISTA DE SIGLAS

cDNA – DNA complementar

Cm - Centímetro

CT - Cycle-threshold

DEPC – Dicarbonato de dietila

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DTT - Ditioteitrol

GAPDH – Gliceraldeído desidrogenase

M - Molar

mg - Mili gramas

mL – Mili litros

mM – Mili molar

M-MLV - *Moloney Murine Leukemia Virus*

Nm - Nanômetros

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – Reação em cadeia da polimerase

qRT PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

RCF – Força centrífuga relativa

rRNA – RNA ribossomal

RT PCR – Reação de transcriptase reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase

SDS – Dodecil sulfato de sódio

TGSA – Tiocianato de guanidina- sulfato de amônio

UV – Ultravioleta

V - *Volts*

xG- força gravitacional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. O Ácido Ribonucleico (RNA).....	16
1.2. Técnicas de extração de RNA	16
1.3. Salting out.....	20
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral.....	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3. METODOLOGIA	22
3.1. Esquema geral	22
3.2. Extração	23
3.3. Eletroforese.....	24
3.4. Ensaio de Bradford	24
3.5. PCR e RT PCR.....	24
3.6. qRT-PCR	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Efeito do tiocianato de guanidina	26
4.2. Efeito do Sulfato de Amônio na precipitação do RNA	27
4.3. Extração	29
4.4. Ensaio de Bradford	32
4.5. PCR e RT PCR.....	34
4.6. qRT-PCR	35
5. COMPARAÇÃO DE PREÇOS ENTRE TGSA E KITS COMERCIAIS	37
6. DADOS PARCIAIS	42
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	43
8. REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

Nos seres vivos, a informação genética é armazenada no ácido desoxirribonucleico (DNA) e expressada na forma de ácido ribonucleico (RNA) por intermédio da enzima RNA polimerase em um processo denominado transcrição. Os transcritos (moléculas de RNA) podem ser tanto produto final, como os RNAs ribossomais e transportadores, quanto RNAs mensageiros que posteriormente serão traduzidos gerando proteínas – os produtos finais da expressão gênica (NIELSEN, 2011).

Todas as funções que as células e os tecidos desempenham são ditadas pela expressão gênica. De um modo geral, a caracterização do RNA quase sempre está relacionada à transcrição e normalmente são analisados o nível de abundância de um ou de vários transcritos. Metodologias eficientes têm sido desenvolvidas para isolar RNA de qualidade e estas técnicas vem sendo analisadas e refinadas continuamente. Via de regra, os métodos visam extrair RNA citoplasmático, RNA nuclear ou RNA total. Os protocolos baseiam-se na lise por meio de tampões divididos em duas categorias: os que rompem o núcleo e os que o mantém intacto. Estes tampões são acompanhados de agentes caotrópicos, detergentes e substâncias que quebram pontes dissulfídicas para desnaturar as RNAses. As organelas e debris celulares são removidos por centrifugação diferencial e a purificação normalmente é realizada por solubilização de biomoléculas em solventes orgânicos como fenol e clorofórmio (FARREL, 2010).

Dois fatores são cruciais para que se tenha sucesso em análises baseadas no RNA: sua pureza e integridade. Um RNA de baixa qualidade compromete significativamente o resultado de aplicações *downstream*, que geralmente são laboriosas e demandam um alto custo (IMBEAUD et al, 2005).

De acordo com Chomczynski e Sacchi (1987) a combinação de tiocianato de guanidina – um potente agente caotrópico - com fenol e clorofórmio promove uma extração de RNA com alto rendimento, puro e não degradado. Embora tenha um material puro e de qualidade com esta técnica, o fenol, além de ser altamente tóxico, interfere na quantificação do RNA por absorver luz UV a 260 nm (JAVADI et al, 2014).

Uma alternativa à extração fenol-clorofórmio é a técnica que utiliza colunas cromatográficas baseadas em sílica, as quais possuem afinidade com os ácidos nucleicos, entre eles o RNA, e são disponibilizadas em kits comerciais. O inconveniente das colunas é que

limitam a quantidade de RNA por extração à quantidade que cada coluna suporta, além do alto custo de cada reação.

Outra alternativa a ser explorada para purificar ácidos nucleicos pode ser a técnica de *salting out* empregada na extração de DNA, inicialmente estabelecido por Miller, Dykes e Polesky (1988). Os autores utilizaram solução saturada de NaCl para remover as proteínas e purificar DNA. Em 2006, Freitas, Santos e Prazeres otimizaram o método de *Salting out* com sulfato de amônio e isopropanol para precipitação de proteínas e de outras biomoléculas na purificação de DNA plasmidial. Em 2014, Javadi et al compararam o método fenol-clorofórmio e a técnica de *salting out* com NaCl e mostraram que não haviam diferenças significativas entre os dois métodos para purificação de DNA genômico de aproximadamente 600 pacientes. No entanto, não houve ainda otimizações desta técnica para purificar RNA.

Sendo assim, a combinação de tiocianato de guanidina com o método de *salting out* pode ser uma ótima alternativa para extração e purificação de RNA.

1.1. O Ácido Ribonucleico (RNA)

O RNA é um polímero longo de ribonucleosídeos monofosfato ligados entre si por ligações fosfodiéster e não apresenta ramificações. Tanto os RNAs eucarióticos quanto procarióticos são essencialmente de cadeia simples (FARREL, 2010).

1.2. Técnicas de extração de RNA

1.2.1. Tiocianato de guanidina – Fenol – clorofórmio:

Esta técnica foi desenvolvida por Chomczynski e Sacchi em 1987 utilizando células e tecidos em cultura como fonte de RNA. O método consiste em utilizar uma solução desnaturante para homogeneizar as células ou tecido, seguido de purificação por fenol e clorofórmio. Eles utilizaram 100 mg de tecido mamário de ratos. Maceraram rapidamente o tecido no gelo e homogeneizaram, à temperatura ambiente, com 1 mL de uma solução desnaturante que continha 4 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio (pH 7), 0,5 % de sarcosyl (detergente) e 0,1 M de 2-mercaptoetanol (agente redutor). Posteriormente,

o homogenato foi transferido para um tubo de polipropileno de 4 mL e foi adicionado 0,1 mL de acetato de sódio 2 M (pH 4), 1 mL de fenol saturado em água e uma mistura de clorofórmio e 0,2 mL de álcool isoamílico (49:1). Realizaram a mistura por inversão, após adição de todos os reagentes. A suspensão final foi vigorosamente misturada por 10 segundos e deixaram a solução no gelo por 15 minutos. Os solventes orgânicos, ao entrarem em contato, formaram uma solução de duas fases: uma orgânica e uma aquosa. A amostra foi centrifugada a 10.000 xG por 20 minutos a 4 °C. O RNA permaneceu solúvel na fase aquosa enquanto que DNA estava presente na fase orgânica. As proteínas se concentraram em uma porção entre as duas fases (interfase). A fase aquosa contendo RNA foi isolada e transferida a outro tubo para precipitação do RNA em 1 mL de isopropanol a -20 °C por 1 hora. A amostra foi centrifugada a 10.000 xG por 20 minutos para a precipitação do RNA. O RNA foi ressuspensionado novamente em 0,3 mL da solução desnaturante e transferido para um tubo Eppendorf de 1,5 mL e precipitado pela segunda vez em 1 volume de isopropanol a -20 °C por 1 hora. Após precipitação, o RNA foi lavado em álcool 75 % e ressuspensionado em água DEPC com 0,5% de SDS.

Formulações comerciais de tiocianato de guanidina e fenol estão disponíveis. A empresa Sigma Aldrich fornece a formulação com o nome de *TRI Reagent*® e a empresa Thermo Fisher disponibiliza o *TRIzol Reagent*®. Essas formulações foram aprimoramentos do método de Chomczynsky e Sacchi (1987).

1.2.2. Centrifugação em gradiente de densidade:

Esta técnica consiste em separar moléculas em um gradiente de densidade por ultracentrifugação. Ela é realizada, geralmente, após lise celular ou tecidual com tampões baseados em guanidina. Proteínas possuem densidade 1,2 – 1,5 g/mL; a densidade do DNA é 1,5 – 1,7 g/mL e do RNA é 1,7 – 2,0 g/mL. Essas diferenças sutis de densidade permitem a separação dessas biomoléculas por formação de bandas ao longo do gradiente ou precipitação. As biomoléculas se movem pelo gradiente de densidade até atingirem o ponto do gradiente que é equivalente à sua própria densidade. As substâncias químicas para obtenção dos gradientes mais comuns para separação do DNA das amostras de RNA são: cloreto de céσιο (CsCl), trifluoroacetato de céσιο (CsTFA) e sulfato de céσιο (CS₂SO₄)⁸.

Cloreto de céσιο (CsCl) é um sal que possui alta densidade e é capaz de gerar gradientes quando submetido a uma ultracentrifugação em suspensão homogênea, não sendo necessário formar o gradiente previamente. Moléculas de alta densidade, como o RNA, são depositadas

no fundo do tubo pois excedem a densidade máxima do Cloreto de céσιο. Utilizando micro-ultracentrífugas é possível precipitar RNA em poucas horas. Esse sal foi utilizado para extração de RNA por Glisin, Crkvenjakov e Byus em 1974 e por Chirgwin et al em 1979. O método descrito a seguir é uma adaptação dos protocolos originais descrito por Farrel em 2010 utilizando cloreto de céσιο.

Tecidos em cultura foram lavados com PBS gelado e a maior quantidade possível de PBS foi descartada. Os tecidos foram ressuspensos em um tampão de lise contendo 6 M de hidrocloreto de guanidina ou 4 M de tiocianato de guanidina, 5 mM de citrato de sódio (pH7), 0,5% de sarcosyl e 10 mM de 2-mercaptoetanol. Posteriormente as células ou tecidos foram rompidas por homogeneização manual ou mecânica (Polytron). Foi aplicado 5,7 M de CsCl (dissolvido em 100 mM de EDTA, pH 7,5) ocupando cerca de 25% do tubo para micro-ultracentrífuga. O homogenato foi colocado cuidadosamente sobre o CsCl até completar o tubo formando uma camada. O RNA foi precipitado por 3 a 4 horas de centrifugação seguindo recomendações de força centrífuga (RCF) do guia do *Swinging bucket rotor* para purificação de RNA - cada rotor tem um RCF específico. Ao terminar a centrifugação, 80 % do sobrenadante foi retirado cuidadosamente por aspiração com pipeta de Pasteur e descartado. O tubo foi cortado acima da banda do precipitado de RNA. O precipitado foi ressuspendido em um mínimo volume possível de solução tampão (10 mM Tris, 5 mM EDTA, 0,1% de SDS), transferido a um tubo de microcentrífuga e realizada a purificação por fenol – clorofórmio descrita anteriormente.

Trifluoracetato de céσιο (CsTFA) disponibilizado pela empresa Ge Healthcare, é uma ótima alternativa para o CsCl. Semelhantemente ao CsCl, o CsTFA forma um gradiente quando submetido a ultracentrifugação. O ânion trifluoracetato é um forte caotrópico e propicia preparações de ácidos nucleicos de alta qualidade uma vez que promove uma maior dissociação de proteínas dos mesmos. CsTFA é capaz de formar bandas bem distintas devido sua alta densidade e possibilita recuperar DNA, RNA e proteína do mesmo gradiente. Além disso, é solúvel em solventes polares e um forte inibidor de RNAses. A desvantagem do método é o alto custo do material; necessidade de ultracentrifugação por longos períodos de tempo; preparação de poucas amostras por experimento. Devido ao surgimento de novos reagentes e kits o uso desta técnica se tornou raridade. O método descrito a seguir é uma adaptação do método de Okayama et al (1987) descrito por Farrel em 2010 utilizando trifluoracetato de céσιο.

Tecidos em cultura foram lavados com PBS gelado e a maior quantidade possível de PBS foi descartada. Cada grama de tecido foi ressuspendido em 18 mL de uma solução

contendo 5,5 M de tiocianato de guanidina, 25 mM de citrato de sódio, 0,5 % de sarcosil. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e em seguida foi adicionado 200 mM de 2-mercaptoetanol. Posteriormente as amostras foram homogeneizadas manualmente ou de forma mecânica (Polytron). O lisado foi centrifugado a 1.500 xG por 5 minutos para precipitar materiais insolúveis. O sobrenadante foi passado para um novo tubo e centrifugado a 5.000 xG por 20 minutos a 15 °C para remover os debris celulares. O sobrenadante cuidadosamente foi repassado para um novo tubo no qual foi aplicado 25% do total do tubo de CsTFA formando uma camada e centrifugado a 125.000 xG em um *Swinging bucket rotor* entre 16 – 20 horas a 15 °C. Ao terminar a centrifugação, o RNA estava presente no fundo do tubo e o DNA na terceira banda mais baixa do gradiente. A maior parte do sobrenadante foi aspirado, evitando encostar no RNA precipitado. O tubo foi cortado acima da banda do RNA e o mesmo foi ressuspensionado em água livre de RNase ou tampão TE pH 7,4 (10 mM Tris-Cl, pH 7,4; 0,1 mM de EDTA) e vortexado. O RNA foi transferido a um novo tubo e aquecido a 65 °C por 10 minutos e vortexado novamente. Foi realizado um “Spin” a baixa velocidade para remover qualquer material insolúvel e armazenado em -80 °C.

1.2.3. Colunas (filtros) cromatográficas de sílica:

Um avanço muito importante no que diz respeito à purificação de ácidos nucleicos é o desenvolvimento de pequenos filtros de sílica para uso em centrífugas comuns. Esses filtros são microfibras de vidro no fundo de uma inserção de plástico que se encaixa no tubo de uma microcentrífuga. De um modo geral, o RNA (ou DNA) se liga à sílica em altas concentrações de sais e um ambiente caotrópico é criado por ação do tiocianato de guanidina presente nos tampões de lise. Após uma série de lavagens, o RNA é eluído da coluna cromatográfica devido à baixa condição salina. Desta maneira, o RNA é purificado e lavado em um curto período de tempo.

O que irá determinar se RNA ou DNA será recuperado na coluna cromatográfica é o manuseio do material biológico e a formulação do tampão de lise. O isolamento de DNA pode ser realizado por tampão de lise alcalino no qual foi adicionado RNase. Dessa maneira, o RNA será degradado e o DNA poderá ser isolado. Alternativamente, DNase pode ser utilizada para promover degradação do DNA e o RNA poderá ser isolado. Pode-se considerar também uma lise suave com o detergente NP-40 para remover o núcleo e submeter a solução (citoplasma) à coluna cromatográfica. Esse procedimento irá render apenas RNAs citoplasmáticos. É um método rápido, fácil e dispensa uso de solventes orgânicos.

Também existem colunas cromatográficas especializadas em isolar transcritos poliadenilados. As colunas apresentam nucleotídeos de timina - Oligo(dT)- que em altas concentrações de sais promovem a hibridização da cauda poli-A dos transcritos com o Oligo(dT). (FARREL, 2010).

1.3. *Salting out*

A solubilidade de biomoléculas em água, em especial as proteínas, é afetada na presença de sais em diferentes concentrações. Dependendo da natureza do sal e sua concentração, pode-se ter um efeito onde as biomoléculas aumentam sua solubilidade em água (efeito *salting in*) ou perdem sua solubilidade em água (efeito *salting out*) (ARAKAWA e TIMASHEFF, 1984).

Baixas concentrações salinas promovem uma maior solubilização das macromoléculas em água. Em baixas concentrações, os sais estabilizam as biomoléculas por interações eletrostáticas não específicas entre seus íons e grupos carregados das biomoléculas, neutralizando-as e promovendo agregação com o solvente (*salting in*). Em concentrações salinas mais altas, ocorrerá interações entre os íons e os grupos carregados das biomoléculas de forma que a deixará muito carregada, promovendo interações entre seus próprios grupos carregados e conseqüentemente perda de solubilidade (*salting out*) (ZHOU, 2005). Em altas concentrações também pode ocorrer efeito *salting in* dependendo da natureza e concentração do sal (ARAKAWA e TIMASHEFF, 1984).

Sulfato de amônio é um sal de escolha para processos de precipitação de proteínas devido sua alta solubilidade e conseqüentemente alta força iônica (BURGESS, 2009). A técnica de *salting out* utilizando sulfato de amônio é uma alternativa para purificação de DNA e tem sido otimizada nos últimos anos. Porém, até o momento a técnica de *salting out* não foi otimizada para extração de RNA. Sendo assim, propomos neste trabalho a otimização do método de *salting out* voltado para purificação de RNA utilizando sulfato de amônio, como uma alternativa para substituir o uso do sistema orgânico fenol clorofórmio.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Desenvolver um protocolo de baixo custo de extração de RNA de alta qualidade a partir de células em cultura dispensando o uso de solventes orgânicos.

2.2. Objetivos Específicos

- Testar os efeitos das concentrações do sulfato de amônio na purificação e recuperação do RNA.
- Testar as concentrações de tiocianato de guanidina necessários para solubilizar o RNA e desnaturar as proteínas.
- Comparar qualitativa e quantitativamente o RNA proveniente desta técnica (TGSA) com RNA extraído de colunas de kits comerciais disponíveis.
- Sintetizar DNA complementar (cDNA) e comparar, por qPCR, o cDNA produzido a partir de RNA purificado pela técnica TGSA com aquele obtido por cromatografia em coluna.
- Comparar custos por reação de kits comerciais mais utilizados com o método desenvolvido neste trabalho.

3. METODOLOGIA

3.1. Esquema geral

A Figura 1 apresenta um esquema geral dos passos da técnica tiocianato de guanidina-sulfato de amônio (TGSA) desenvolvida neste trabalho.

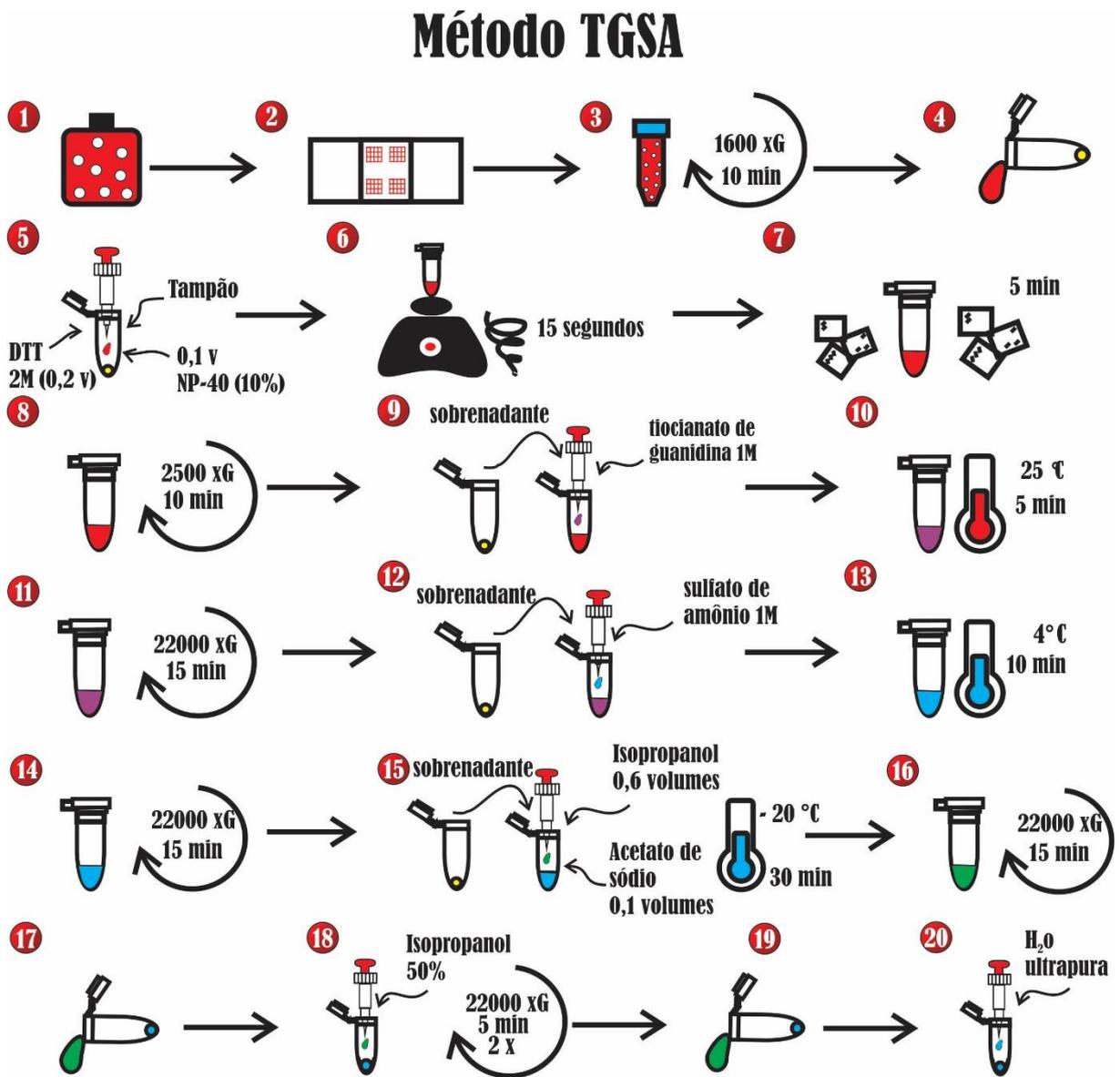


Figura 1 – Esquema geral do método tiocianato de guanidina-sulfato de amônio (TGSA)

FONTE: COSTA (2017)

3.2. Extração

O RNA foi extraído de células de linhagem leucêmica K562. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg /mL de penicilina e 100 µg /mL de estreptomicina (passo 1). As células foram mantidas a 37 °C com atmosfera umidificada, 5 % de CO₂ e o meio foi trocado a cada dois ou três dias. Para realizar as extrações de RNA foram usadas entre 1 e 3 x 10⁶ células por reação (passo 2). Para a realização do protocolo as células foram separadas do meio de cultura por centrifugação a 1600 xG durante 10 minutos a temperatura ambiente (passo 3). O meio foi descartado e as células foram ressuspensas em uma solução tampão (pH 7,8) contendo 140 mM de NaCl, 1,5 mM de MgCl₂, 10 mM de TRIS (passos 4 e 5). Foram utilizados 100 µL de solução tampão a cada 10⁶ células. As células foram fracionadas em tubos de reação de 1,5 mL e adicionado 0,2 volumes de DTT (2M) e 0,1 volume de solução de NP-40 (10% v/v). Em seguida, dez movimentos de aspirado e despejado foram realizados utilizando uma micropipeta p100 (Gilson) para efetuar a lise e as amostras foram *vortexadas* por 15 segundos e deixadas 5 minutos no gelo (passos 6 e 7). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 2500 xG durante 10 minutos para precipitação dos núcleos (passo 8). O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, evitando aspirar o precipitado, e colocado em um novo tubo. Foi adicionado tiocianato de guanidina na concentração final de 1 M, deixando reagir durante 5 minutos a temperatura ambiente para desnaturar as proteínas (passos 9 e 10). Ao final da reação, a amostra foi centrifugada a 22000 xG durante 15 minutos. O sobrenadante foi passado para um novo tubo e adicionado sulfato de amônio na concentração final de 1 M, deixando reagir por 10 minutos a 4 °C (passos 11, 12 e 13). As amostras foram centrifugadas a 22000 xG por 15 minutos e o sobrenadante foi passado para um novo tubo adicionando 0,1 volume de acetato de sódio e 0,6 volumes de isopropanol, deixando 30 minutos a -20 °C (passos 14 e 15). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 22000 xG por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado (passos 16 e 17). O precipitado foi lavado duas vezes com 300 µL de isopropanol 50 % e centrifugado 5 minutos a 22000 xG (passo 18). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensado em 50 µL de água ultrapura (passos 19 e 20) ou armazenados em 0,6 volumes de isopropanol a -20 °C até o uso. Como controle foi utilizado RNA extraído por colunas com kit comercial Norgen seguindo orientações do fabricante. As extrações foram realizadas no mesmo dia com a mesma quantidade de células e nas mesmas condições.

3.3. Eletroforese

As amostras de RNA ou produtos de PCR foram coradas com Gel Red (BIOTIUM), 8 μL de amostra foram misturadas com 2 μL de corante, e submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5 %, durante 20 minutos a 120 V em cuba de eletroforese horizontal de 20 cm. Após a eletroforese, as amostras foram analisadas e documentadas em fotodocumentador Loccus LPix. A quantificação da amostra e análise da curva de pureza foram realizadas no espectrofotômetro *Nanovue plus* (GE HEALTHCARE).

3.4. Ensaio de Bradford

A fim de determinar a concentração de proteínas, as amostras de RNA extraídas pelo método TGSA foram analisadas pelo método padrão de Bradford utilizando o espectrofotômetro *Nanovue plus* (GE HEALTHCARE) e o corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* (THERMO FISHER). A calibração foi feita com uma curva de concentrações conhecidas de albumina (0,11 mg/ μL) e posteriormente foi realizada a quantificação das amostras.

3.5. PCR e RT PCR

Após a extração de RNA com o método TGSA e com o método de cromatografia em coluna com o kit Norgen (grupo controle), foi realizada a síntese da primeira fita do cDNA. A reação foi feita com aproximadamente 500 ng de RNA total. A enzima M-MLV foi utilizada para síntese da primeira fita de cDNA conforme orientações do fabricante, usando oligonucleotídeos poli T como primers. Para amplificar os genes da β - actina e GAPDH foram preparados 25 μL de reação fazendo uso da Taq polimerase platinum (Invitrogen) seguindo protocolo do fabricante. Os primers para a amplificação da β - actina foram 5'GCTGATCCACATCTGCTGG3' (primer direto) e 5'ATCATTGCTCCTCCTCAGCG3' (primer reverso). Para a amplificação do GAPDH foram 5'ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC3' (primer direto) e 5'GTGGTCGTTGAGGGCAATG' (primer reverso). A programação foi de 30 ciclos com uma

desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e a amplificação e hibridização a 60 °C por 30 segundos, seguidos de desnaturações a 94 °C por 20 segundos.

3.6. qRT-PCR

Os cDNAs sintetizados a partir dos RNAs extraídos com os métodos TGSA e kit comercial de colunas cromatográficas foram submetidos a quantificação relativa entre eles por PCR em tempo real. O cDNA foi diluído 10 vezes (1:10) em água ultrapura para as análises. Para preparar a reação, foi utilizado o kit Platinum SYBR Green com ROX (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante e primers para β – actina e GAPDH. Os primers para amplificação de ambos os genes foram os mesmos descritos anteriormente para a PCR convencional e RT – PCR. As amostras foram preparadas em triplicata técnica com um controle negativo para cada gene. A programação foi: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e 40 ciclos com desnaturação a 95 °C por 20 segundos e a hibridização e amplificação acontecendo num único passo a 60 °C por 30 segundos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito do tiocianato de guanidina

Ao efetuar lise celular, as ribonucleases (RNAses) inevitavelmente entrarão em contato com o RNA degradando-o. Inibir a ação das RNAses é essencial para que obtenha RNA não degradado. Além disso, a desnaturação das nucleoproteínas associadas ao RNA é de suma importância para a pureza desse ácido nucleico. Por esse motivo, desnaturantes de proteínas como uréia e sais de guanidina são utilizados no processo de extração de ácidos nucleicos.

Em 1953, Simpson e Kauzmann trabalhando com desnaturação proteica mostraram que os sais de guanidina eram mais eficientes que uréia mesmo em concentrações mais baixas e no ano de 1957, Sela, Anfisen e Harrington inativaram ribonuclease (RNase) utilizando 4 M de cloridrato de guanidina.

Os sais de guanidina são potentes desnaturantes de proteínas evidenciados nos resultados de Cox (1968) e Gordon (1972). Cox extraiu RNA de ribossomos ou fração microsomal de vários tipos celulares utilizando 4 M de cloridrato de guanidina. Gordon determinou a interação dos sais cloridrato de guanidina e tiocianato de guanidina com as proteínas albumina de soro bovino, albumina do ovo e lisozima. A interação dos sais com as proteínas é correlacionada com a sua desnaturação. Os resultados de Gordon mostraram que para a desnaturação proteica máxima eram necessárias concentrações de aproximadamente 6 M de cloridrato de guanidina e aproximadamente 4 M de tiocianato de guanidina.

Em 1987, Chomczynski e Sacchi desenvolveram um método de extração de RNA puro e não degradado que combinava o uso tiocianato de guanidina 4M com fenol e clorofórmio. Desde então, o tiocianato de guanidina tem sido utilizado na concentração de 4 M diretamente nos tampões em extrações de ácidos nucleicos, em especial o RNA. No entanto, não houve um trabalho anterior que analisasse diferentes concentrações do tiocianato de guanidina aplicados à extração de RNA. O foco era voltado para a concentração necessária para desnaturar a maior quantidade possível de nucleoproteínas. A fim de determinar uma melhor concentração do tiocianato de guanidina voltado para extração de RNA, nós testamos três concentrações (1, 2 e 4 M). Como pode ser observado na Figura 2, a concentração de 1 M de tiocianato de guanidina já é suficiente para desnaturar proteínas associadas ao RNA e seu efeito não difere visualmente no gel de agarose das demais molaridades. Além disso, essa molaridade foi capaz de realizar

tanto *salting in* de RNA quanto *salting out* de grande parte das proteínas simultaneamente, utilizando quatro vezes menos tiocianato de guanidina do que o utilizado nos protocolos atuais.

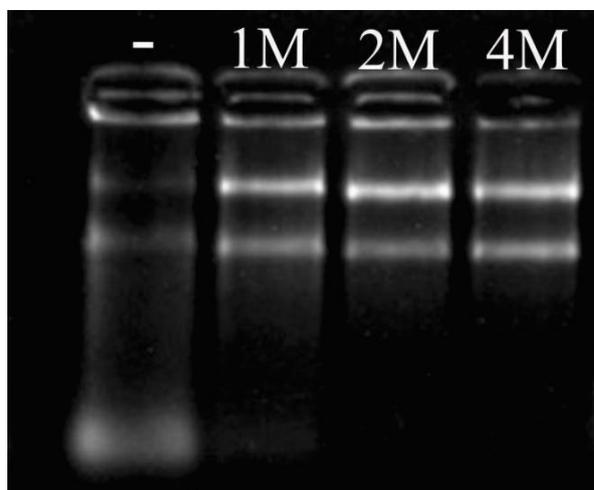


Figura 2 - Efeito da concentração do tiocianato de guanidina nas extrações de RNA. Primeiro poço à esquerda não contém guanidina (-). Os demais poços contêm guanidina nas concentrações indicadas.

FONTE: COSTA (2017)

A diferença entre os dois sais de guanidina comumente usados para extração de ácidos nucleicos é que o tiocianato de guanidina forma tanto íons quanto cátions que são fortes caotrópicos enquanto que o cloridrato de guanidina apresenta apenas um cátion. Esses íons interagem nas ligações dos aminoácidos e interferem nas pontes de hidrogênio das proteínas, alterando sua conformação nativa e causando desnaturação. A ação desnaturante desses íons é potencializada na presença de um agente redutor, como β -mercaptoetanol e ditioneitol (DTT – utilizado neste trabalho) que atuam quebrando pontes dissulfeto das proteínas.

4.2. Efeito do Sulfato de Amônio na precipitação do RNA

Após o processo de desnaturação de proteínas com tiocianato de guanidina, os protocolos procedem com a purificação do RNA utilizando solventes orgânicos à base de fenol-clorofórmio ou através de processos cromatográficos. Uma alternativa para realizar este processo de forma mais barata e segura seria a utilização da técnica de *salting out* com sulfato de amônio para purificar o RNA. Em 2006, Freitas, Santos E Prazeres utilizaram sulfato de amônio para retirar proteínas e isopropanol para precipitar DNA plasmidial. A purificação foi feita por HPLC e dessaltação em coluna. Em 2016, em seu trabalho de conclusão de curso, Pinto et al (artigo em preparação) otimizou a técnica de Freitas, Santos e Prazeres. Ele diminuiu

a concentração do sulfato de amônio após *salting out* de proteínas de 2 M para 0,5 M com água ultrapura e realizou uma segunda precipitação em 0,7 volumes de isopropanol. Com essa otimização, foi dispensada a dessaltação por coluna e HPLC do método original e resultou na obtenção de um DNA plasmidial com alto grau de pureza.

Visando precipitar as proteínas que ainda estavam solúveis após *salting out* com tiocianato de guanidina e promover a purificação do RNA, foram testadas molaridades diferentes do sulfato de amônio, a fim de eleger qual a melhor concentração que removia as proteínas e evitava precipitação do RNA. A Figura 3 mostra as concentrações de sulfato de amônio testadas com RNA total extraído por coluna. Aparentemente não houve diferença na recuperação do RNA após aplicação do sulfato de amônio nas diferentes molaridades. No entanto, para remoção de proteínas, molaridades de 0,5 M ou mais altas foram mais eficientes. Após aplicação de sulfato de amônio a partir de 0,5 M não se tem mais proteínas em solução (tabela 1).

Para garantir que todas as proteínas fossem precipitadas, a concentração de sulfato de amônio escolhida foi 1 M.

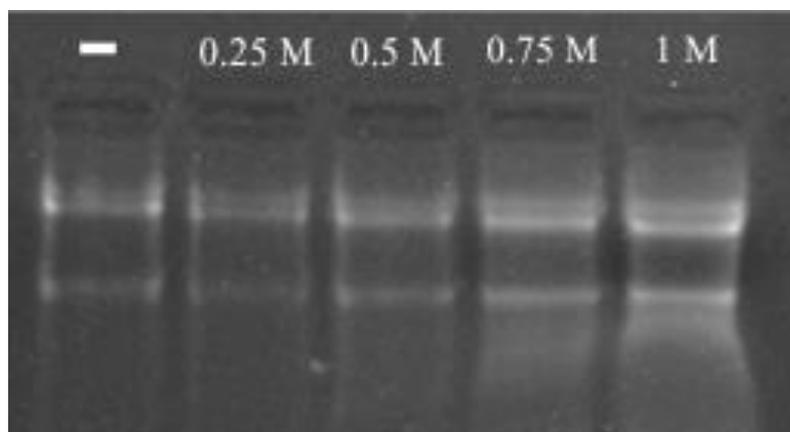


Figura 3 - Efeito das concentrações do sulfato de amônio sobre RNA purificado por coluna. O primeiro poço não contém sulfato de amônio (-). Demais poços contém sulfato de amônio nas concentrações indicadas na Figura.

FONTE: COSTA (2017)

Concentração do sulfato de amônio	Presença (+) /ausência (-) de proteínas
0	+
0,25 M	+
0,5 M	-
0,75 M	-
1 M	-

Tabela 1 – Efeito de diferentes concentrações de sulfato de amônio na Presença ou ausência de proteínas no RNA purificado.

FONTE: COSTA (2017)

Ao utilizar sulfato de amônio 1 M após a aplicação de tiocianato de guanidina, observa-se a formação de duas fases. Essas fases se formam por um comportamento do sulfato de amônio nessa concentração que, na presença do detergente NP-40, confere uma certa viscosidade na reação podendo formar agregados filamentosos na solução ou na superfície. Porém, esses agregados da reação de sulfato com NP-40, quando submetidos ao isopropanol, solubilizam-se e não precipitam juntos com o RNA. Ao aspirar o sobrenadante, deve ser evitado o contato com o precipitado formado (proteínas restantes) após centrifugação do sulfato de amônio, mesmo que não seja visível.

4.3. Extração

Após os testes para determinação das concentrações dos reagentes, as molaridades mais eficientes de tiocianato de guanidina em conjunto com sulfato de amônio para proceder com a extração/purificação de RNA foram estabelecidas em 1 M. A Figura 4 mostra uma extração feita pelo método TGSA (tiocianato de guanidina – sulfato de amônio) comparada com extrações feitas com colunas cromatográficas comerciais (NORGEN - total RNA purification kit).

A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1,5 %, observando as bandas dos RNAs ribossomais (rRNAs) 28 S e 18 S (no caso de eucariotos). A banda do rRNA 28S deve ser aproximadamente duas vezes mais intensa que a banda do rRNA 18S. Ao contrário de

extrações de RNA citoplasmático, pode-se encontrar em extrações de RNA total uma banda acima do 28 S referente ao ácido ribonucleico de alto peso molecular (hnRNA). O RNA extraído com o método TGSA apresentou as características de integridade dos RNAs ribossomais de forma similar às amostras de RNA purificadas com colunas. A banda acima do 28 S nos poços 3 e 4 tratam-se, possivelmente, de RNAs pré-processados de alto peso molecular. A diferença na migração dos rRNAs 5 S ocorreu devido ao fato de os RNAs de coluna terem sido eluídos em 50 μ L de *Elution buffer* do próprio kit, o qual apresenta sais que interferem na migração. Já os RNAs provenientes do método TGSA foram eluídos em 50 μ L de H₂O ultrapura.

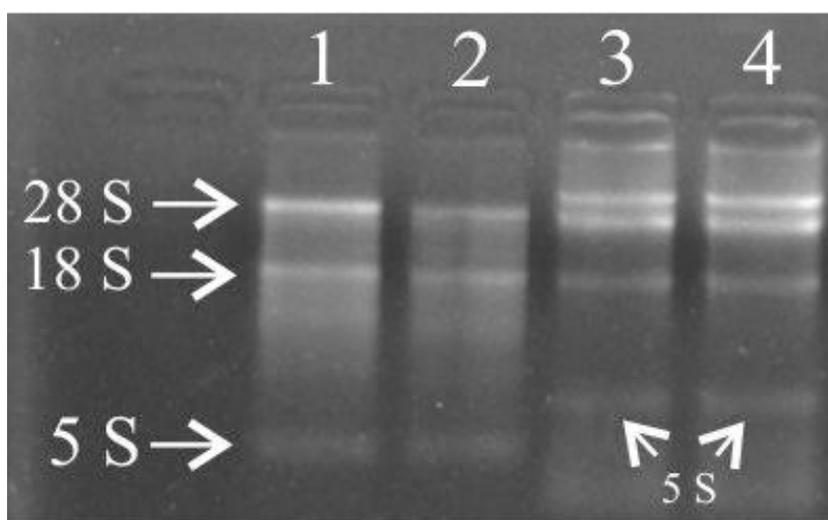


Figura 4 - Comparação entre duplicatas de extrações com TGSA e coluna cromatográfica em gel de agarose 1,5 % não desnaturante. Foram carregados aproximadamente 1,7 μ g de RNA por poço. As setas indicam os RNAs ribossomais 28 S e 18 S. Os poços 1 e 2 são as duplicatas do método TGSA e os poços 3 e 4 são as duplicatas do método de coluna.

FONTE: COSTA (2017)

A concentração de RNA, DNA e proteínas podem ser mensuradas através da absorção de luz ultravioleta. Ácidos nucleicos absorvem luz ultravioleta a 260 nm, enquanto que proteínas absorvem a 280 e outras moléculas contaminantes, como alguns sais, absorvem a 230 nm. A fim de estimar a pureza dos ácidos nucleicos, pode-se calcular a taxa de absorção a 260 nm pela taxa de absorção a 280 nm (A_{260}/A_{280}) e a taxa de absorção a 260 nm pela taxa de absorção a 230 nm (A_{260}/A_{230}). Para que um RNA seja considerado puro e apto para processos *downstream*, a relação A_{260}/A_{280} deve estar entre 1,8 e 2,2 e a relação A_{260}/A_{230} deve ser maior que 1,7.

A Figura 5 mostra a curva de pureza do RNA extraído com o método TGSA (Painel A) e o método de coluna (Painel B) e suas respectivas concentrações em ng/ μ L. Ambos

apresentaram alto grau de pureza evidenciado pelo pico máximo de absorvância a 260 nm e as relações A260/A280 e A260/A230 estão expressas no Painel C (TGSA) e D (Coluna). Os valores para o método de TGSA para A260/A280 foram 1,87 e os valores para A260/A230 foram 1,97 indicando que o RNA estava puro e apto para processos *downstream* como, por exemplo, análises de expressão gênica por RT-qPCR.

A quantidade final de RNA pelo método de TGSA foi menor em relação ao método de coluna devido ao fato de passar por processos de precipitação, o que acarreta em perda de material. Com o método de TGSA é possível obter em média 200 ng/μL de RNA a partir de células em cultura entre 1 e 3 x 10⁶ células por mL. Vale ressaltar que essa concentração de RNA é aproximadamente 20 vezes maior do que o necessário para, por exemplo, produzir cDNA.

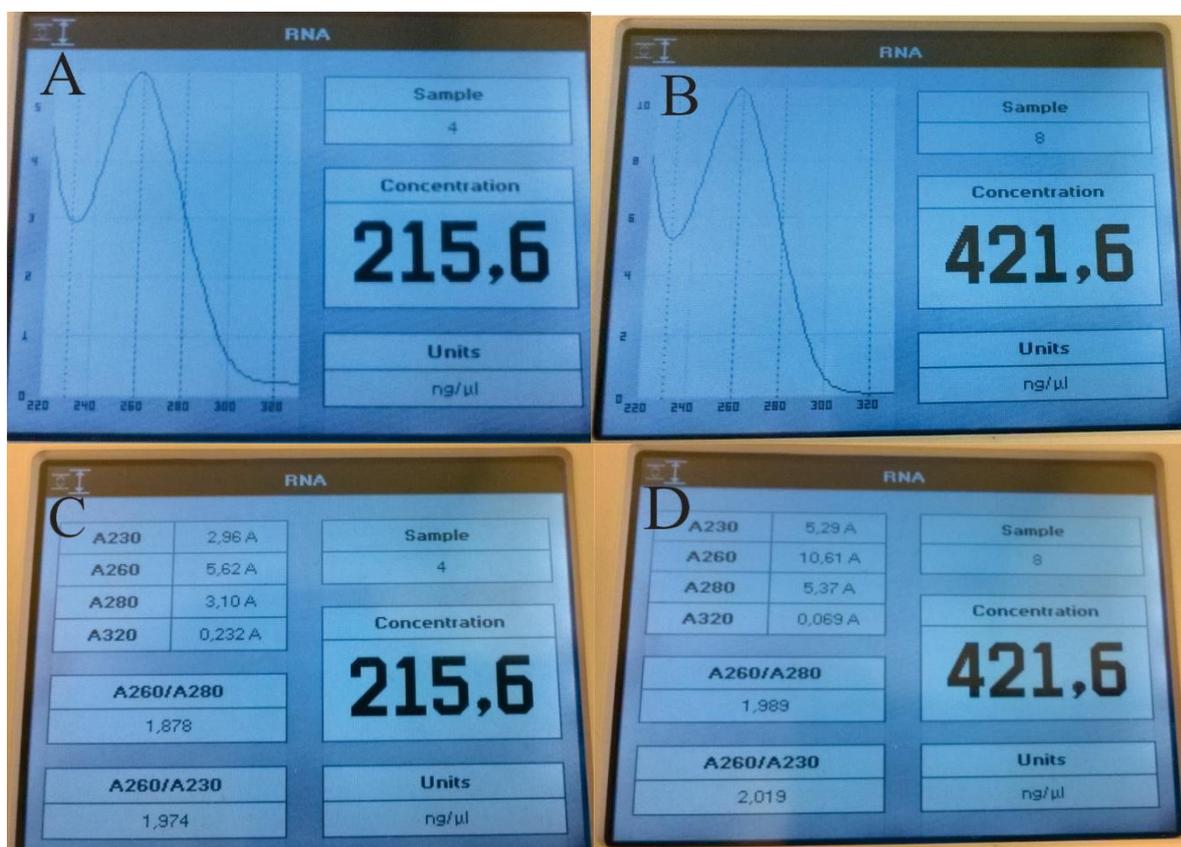


Figura 5 – Análise da concentração e pureza de amostras representativas de RNA extraído pelo método TGSA ou por coluna cromatográfica. (A) mostra a curva de absorvância do RNA extraído com o método TGSA e (B) mostra a curva de absorvância do método de coluna. (C) indica a relação de absorvância A260/A280 e A260/A230 do método TGSA e (D) indica a relação de absorvância A260/A280 e A260/A230 do método de coluna cromatográfica.

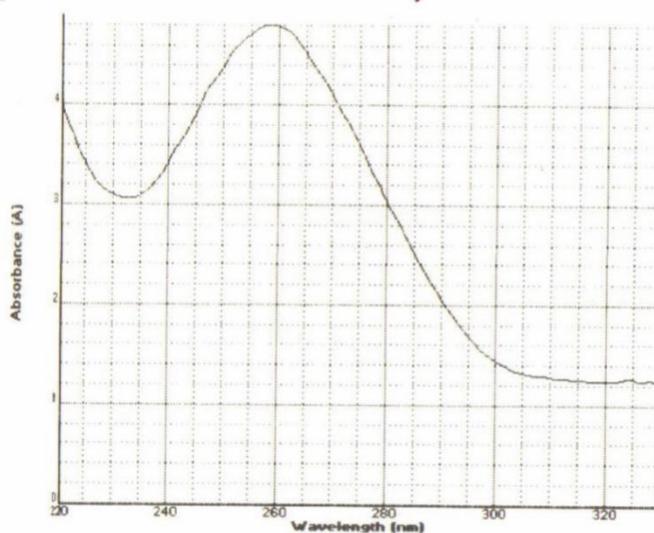
FONTE: COSTA (2017)

4.4. Ensaio de Bradford

O método de Bradford foi usado para a quantificação de proteínas da amostra do RNA extraído pelo método de TGSA. O RNA utilizado no ensaio apresentava relação $A_{260}/A_{280} = 1,97$ e relação $A_{260}/A_{230} = 1,9$. O Painel A da Figura 6 mostra as propriedades do RNA utilizado como amostra, bem como sua curva de pureza. O Painel B indica os parâmetros utilizados na calibração do aparelho *NanoVue plus* e a curva padrão de albumina. O Painel C apresenta os valores de concentração encontrados na amostra. Os resultados indicaram que não havia contaminação com proteína na amostra. Todas as leituras ficaram abaixo do limite de detecção do método de Bradford.

A

RNA			
Product	NanoVue		
Version	4262 V2.0.4		
Serial Number	119345		
Date	22 September 2017		
Time	20:56:05		
Instrument Calibration Pass			
22 September 2017 20:50:11			
Pathlength	Automatic		
Dilution Factor	1.000		
Background	On		
Factor	40.0		
Units	ng/ μ l		
Sample 1			
Concentration	142.0 ng/ μ l		
Pathlength	0.5 mm		
A230	A260	A280	A320
3.10	4.79	3.04	1.24
A260/A280		A260/A230	
1.972		1.909	



B

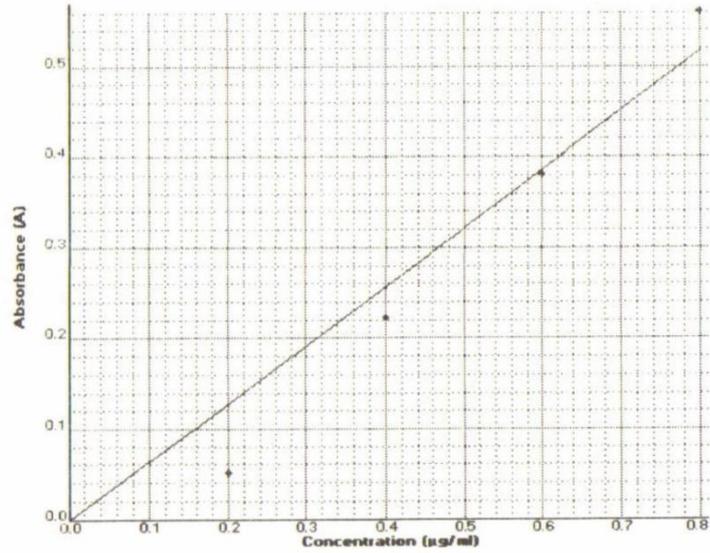
Bradford

Product NanoVue
 Version 4282 V2.0.4
 Serial Number 119345
 Date 22 September 2017
 Time 21:34:00

Instrument Calibration Pass
 22 September 2017 20:50:11

Wavelength 595 nm
 Standards 4
 Replicates Off
 Units $\mu\text{g/ml}$
 Pathlength 0.5 mm
 Calibration Standards
 Date 22 September 2017
 Time 21:13:19
 Curve Fit Zero Regression
 $y = 0.6453x$, $R^2 = 0.9812$

Standard $\mu\text{g/ml}$	Absorbance \AA
0.200	0.050
0.400	0.221
0.600	0.38
0.800	0.56



C

<u>Sample</u>	<u>Absorbance</u>	<u>Concentration</u>
1	-0.211	----
2	-0.216	----
3	-0.192	----
4	-0.203	----
5	-0.096	----

Figura 6 - Propriedades do RNA extraído pelo método de TGSA após otimização total do mesmo apresentando quantificação e análise de pureza (A). Parâmetros de calibração de curva de albumina padrão (B). Quantificação das proteínas da amostra de RNA (Painel C).

FONTE: COSTA (2017)

4.5. PCR e RT PCR

Os RNAs extraídos foram submetidos à RT-PCR para avaliar sua funcionalidade. A síntese do cDNA é uma forma de mostrar que o RNA extraído está funcional. A extração de um material puro e íntegro é necessária para que se tenha sucesso na transcrição reversa ou em

qualquer outro processo *downstream*. A Figura 5 mostra a amplificação de um fragmento do cDNA do gene da β – actina (Painel A – 90 pb) e do gene GAPDH (Painel B – 83 pb). Não houveram divergência entre as amostras de RNA extraído pelo método TGSA e pelo método de coluna e o cDNA de ambos os genes foram amplificados. A banda mais baixa no poço 1 Painel A da amplificação da β – actina corresponde a uma alteração na salinidade da amostra na reação de PCR o que fez com que o fragmento migrasse de forma diferenciada.

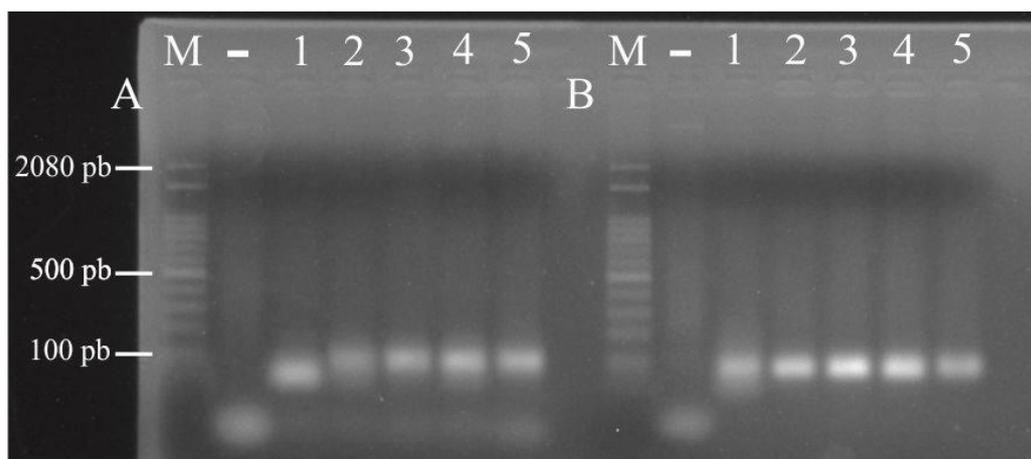
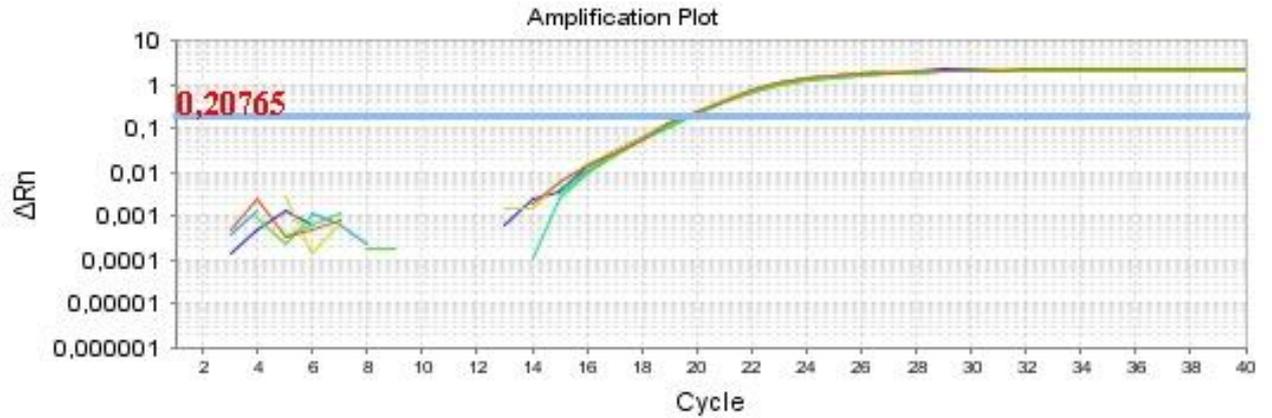


Figura 7 – Imagem de gel de agarose mostrando a amplificação de cDNA do gene β – actina (A) e a amplificação do cDNA do gene GAPDH (B); M = marcador de peso molecular 100 pb. O poço (-) é o controle negativo. Os poços 1 e 2 são amplificações com RNA extraído pelo método de TGSA e os poços 3, 4 e 5 são amplificações com RNA extraído pelo método de coluna.

FONTE: COSTA (2017)

4.6. qRT-PCR

A fim de comparar a amplificação entre os dois métodos, foi realizado o ensaio de qRT-PCR. As Figuras 8 e 9 mostram a amplificação do gene GAPDH e β – actina respectivamente, com cDNA diluído 1:10 em água ultrapura. Os cDNAs obtidos a partir as amostras de RNA purificadas tanto de método TGSA quanto do método de coluna cromatográfica, amplificaram de forma muito similar, atingindo o CT aproximadamente no ciclo 19 para GAPDH e aproximadamente no ciclo 22 para β – actina. As sobreposições das amostras indicaram que tanto o RNA proveniente do método de coluna quanto do método de TGSA se comportaram da mesma maneira durante o ensaio. Desta forma, o RNA extraído com método TGSA tem qualidade comparável à do método de coluna e não diferem um do outro quando avaliados por qPCR ($P= 0,799$).

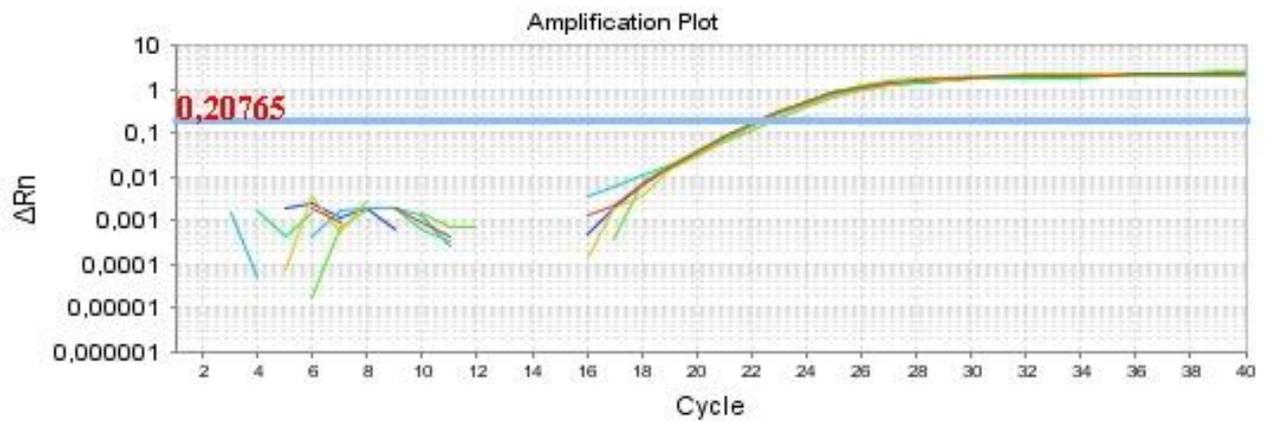


TGSA ■ ■ ■

Coluna ■ ■ ■

Figura 8 - Comparação da amplificação do cDNA proveniente da técnica TGSA e coluna cromatográfica com primers específicos para o gene GAPDH. Em todos os casos o cDNA foi sintetizado a partir da mesma quantidade de RNA.

FONTE: COSTA (2017)



TGSA ■ ■ ■

Coluna ■ ■ ■

Figura 9 - Comparação da amplificação do cDNA proveniente da técnica TGSA e coluna cromatográfica com primers específicos para o gene β -actina. Em todos os casos o cDNA foi sintetizado a partir da mesma quantidade de RNA.

FONTE: COSTA (2017)

5. COMPARAÇÃO DE PREÇOS ENTRE TGSA E KITS COMERCIAIS

O método TGSA além de qualidade comparável aos kits comerciais baseados em colunas cromatográficas, apresentou baixo custo por reação. Foi realizado o orçamento de todos os reagentes necessários para a extração do RNA pelo método TGSA, tanto em dólar quanto em real, bem como o número de reações por reagente. As Tabelas 2 e 3 referem-se ao orçamento a partir de produtos da empresa Sigma Aldrich com valores para compra nos Estados Unidos e no Brasil, respectivamente. O preço total por reação em dólar corresponde a **US\$ 0,52** e o preço total por reação em real corresponde a **R\$ 2,66**. Os valores zerados na tabela indicam valores muito menores que US\$ 0,01 ou R\$ 0,01, porém começam a ter significância a partir de 1.000 reações.

ORÇAMENTO DOS REAGENTES DA SIGMA ALDRICH - UNITED STATES (07-10-2017)

REAGENTES	QUANTIDADE	CÓDIGO DO PRODUTO	PREÇO DO PRODUTO (US\$)	QUANTIDADE DE REAÇÕES TOTAIS	PREÇO POR REAÇÃO	PREÇO DE 1000 REAÇÕES/ REAGENTE
DL - DTT	5 g	D0632	\$ 114,50	266	\$ 0,43	\$ 430,45
MgCl ₂	1 kg	M8266	\$ 58,00	340000000	\$ 0,00	\$ 0,00
NaCl	1 kg	S7653	\$ 75,90	5876543	\$ 0,00	\$ 0,01
NP-40	1 L	7438S	\$ 63,10	333000	\$ 0,00	\$ 0,19
Sulfato de amônio	100 g	A4418	\$ 18,10	1050	\$ 0,02	\$ 17,24
Tiocianato de guanidina	100 g	G9277	\$ 89,10	2352	\$ 0,04	\$ 37,88
Isopropanol	1 L	278475 (SKU)	\$ 65,30	2380	\$ 0,03	\$ 27,44
Acetato de sódio	1 kg	S2889	\$ 84,60	19241	\$ 0,00	\$ 4,40
TRIS BASE	100 g	T1503	\$ 27,30	39666666	\$ 0,00	\$ 0,00
TOTAL					\$ 0,52	\$ 517,61

Tabela 2 - Orçamento dos reagentes Sigma (EUA) para extração de RNA com método TGSA.

FONTE: COSTA (2017)

ORÇAMENTO DOS REAGENTES DA SIGMA ALDRICH - BRASIL (07-10-2017)

REAGENTES	QUANTIDADE	CÓDIGO DO PRODUTO	PREÇO DO PRODUTO (R\$)	QUANTIDADE DE REAÇÕES TOTAIS	PREÇO POR REAÇÃO	PREÇO DE 1000 REAÇÕES/ REAGENTE
DL - DTT	5 g	D0632	R\$ 620,00	266	R\$ 2,33	R\$ 2.330,83
MgCl ₂	1 kg	M8266	R\$ 179,66	340000000	R\$ 0,00	R\$ 0,00
NaCl	1 kg	S7653	R\$ 445,00	5876543	R\$ 0,00	R\$ 0,08
NP-40	1 L	7438S	R\$ 443,00	333000	R\$ 0,00	R\$ 1,33
Sulfato de amônio	100 g	A4418	R\$ 98,00	1050	R\$ 0,09	R\$ 93,33
Tiocianato de guanidina	100 g	G9277	R\$ 271,00	2352	R\$ 0,12	R\$ 115,22
Isopropanol	1 L	278475 (SKU)	R\$ 231,00	2380	R\$ 0,10	R\$ 97,06
Acetato de sódio	1 kg	S2889	R\$ 460,00	19241	R\$ 0,02	R\$ 23,91
TRIS BASE	100 g	T1503	R\$ 200,00	39666666	R\$ 0,00	R\$ 0,01
TOTAL					R\$ 2,66	R\$ 2.661,76

Tabela 3 - Orçamento dos reagentes Sigma (BR) para extração de RNA com método TGSA.

FONTE: COSTA (2017)

Também foi realizada uma comparação de custos por reação do método TGSA com demais kits disponibilizados no mercado. As Tabelas 4 e 5 referem-se a kits de alguns fabricantes com seus respectivos números de reações e custo por reação. A Tabela 4 indica os valores dos produtos em dólar nos Estados Unidos e a Tabela 5 indica os valores correspondentes em real no Brasil. Os asteriscos presentes em alguns kits indicam que o valor em dólar foi apenas convertido em real, uma vez que os valores desses kits não estavam disponíveis nos fornecedores brasileiros. TGSA tem um custo de **7,25 vezes menos por reação** comparado com o kit de menor custo listado na Tabela 4 (*GenElute mammalian Total miniprep kit – SIGMA*). Esse kit da Sigma tem um custo por reação de **US\$ 3,77** e propicia 350 reações. Por meio do método de TGSA, o custo por reação é de **US\$ 0,52** para o mesmo número de reações. Quando comparados com preço em reais, TGSA tem um custo de **5,09 vezes menos por reação** comparado ao kit de menor custo listado na Tabela 5 (*PureLink RNA mini kit – THERMO*). Esse kit da Thermo tem um custo por reação de **R\$ 13,56** e propicia 250 reações (podendo aumentar esse valor, levando em conta que foi apenas convertido em real e não foi imposto sobre o produto os valores da importação). Já o custo do TGSA por reação é **R\$ 2,66** para o mesmo número de reações.

COMPARAÇÃO DE PREÇOS ENTRE TGSA E KITS DE FABRICANTES (07-10-2017)

FABRICANTE	KIT	PREÇO	NÚMERO DE EXTRAÇÕES	PREÇO POR EXTRAÇÃO
ThermoFisher	TRIZol plus RNA purification kit	\$ 312,00	50	\$ 6,24
ThermoFisher	PureLink RNA mini kit	\$ 114,00	10	\$ 11,40
ThermoFisher	PureLink RNA mini kit	\$ 258,00	50	\$ 5,16
ThermoFisher	PureLink RNA mini kit	\$ 1.080,00	250	\$ 4,32
Sigma	GenElute Direct mRNA miniprep kit	\$ 151,50	10	\$ 15,15
Sigma	GenElute Direct mRNA miniprep kit	\$ 866,00	70	\$ 12,37
Sigma	GenElute mammalian Total RNA miniprep kit	\$ 56,90	10	\$ 5,69
Sigma	GenElute mammalian Total RNA miniprep kit	\$ 301,50	70	\$ 4,31
Sigma	GenElute mammalian RNA miniprep kit	\$ 1.320,00	350	\$ 3,77
Sigma	GenElute mRNA Miniprep kit	\$ 148,00	10	\$ 14,80
Sigma	Gen Elute mRNA Miniprep kit	\$ 737,00	70	\$ 10,53
Sigma	GenElute Total RNA purification kit	\$ 466,50	100	\$ 4,67
Sigma	GenElute Total RNA purification kit	\$ 249,50	50	\$ 4,99
Norgen	Total RNA purification kit	\$ 233,00	50	\$ 4,66
Norgen	Total RNA purification kit	\$ 447,00	100	\$ 4,47
TGSA	-	\$ 5,18	10	\$ 0,52
TGSA	-	\$ 25,88	50	\$ 0,52
TGSA	-	\$ 36,23	70	\$ 0,52
TGSA	-	\$ 51,76	100	\$ 0,52
TGSA	-	\$ 129,40	250	\$ 0,52
TGSA	-	\$ 181,16	350	\$ 0,52

Tabela 4 - Comparação de preços, em dólares, entre TGSA e kits comerciais

FONTE: COSTA (2017)

COMPARAÇÃO DE PREÇOS ENTRE TGSA E KITS DE FABRICANTES (07-10-2017)

FABRICANTE	KIT	PREÇO	NÚMERO DE EXTRAÇÕES	PREÇO POR EXTRAÇÃO
ThermoFisher	TRIZol plus RNA purification kit *	R\$ 979,68	50	\$ 19,59
ThermoFisher	PureLink RNA mini kit*	R\$ 357,96	10	\$ 35,80
ThermoFisher	PureLink RNA mini kit*	R\$ 810,12	50	\$ 16,20
ThermoFisher	PureLink RNA mini kit*	R\$ 3.391,20	250	\$ 13,56
Sigma	GenElute Direct mRNA miniprep kit	R\$ 935,00	10	\$ 93,50
Sigma	GenElute Direct mRNA miniprep kit	R\$ 5.080,00	70	\$ 72,57
Sigma	GenElute mammalian Total RNA miniprep kit	R\$ 244,00	10	\$ 24,40
Sigma	GenElute mammalian Total RNA miniprep kit	R\$ 1.166,00	70	\$ 16,66
Sigma	GenElute mammalian Total RNA miniprep kit	R\$ 7.695,00	350	\$ 21,99
Sigma	GenElute mRNA Miniprep kit	R\$ 707,00	10	\$ 70,70
Sigma	GenElute mRNA Miniprep kit	R\$ 3.524,00	70	\$ 50,34
Sigma	GenElute Total RNA purification kit	R\$ 2.541,00	100	\$ 25,41
Sigma	GenElute Total RNA purification kit	R\$ 1.358,00	50	\$ 27,16
Norgen	Total RNA purification kit*	R\$ 731,62	50	\$ 14,63
Norgen	Total RNA purification kit*	R\$ 1.403,58	100	\$ 14,04
TGSA	-	R\$ 26,60	10	\$ 2,66
TGSA	-	R\$ 133,00	50	\$ 2,66
TGSA	-	R\$ 186,20	70	\$ 2,66
TGSA	-	R\$ 266,00	100	\$ 2,66
TGSA	-	R\$ 665,00	250	\$ 2,66
TGSA	-	R\$ 931,00	350	\$ 2,66

Tabela 5 - Comparação de preços, em reais, entre TGSA e kits comerciais

FONTE: COSTA (2017)

Os preços por reação citados anteriormente foram calculados para todos os reagentes da empresa Sigma Aldrich, porém podem ser avaliados de outros fornecedores de reagentes. A Tabela 6 mostra um orçamento alternativo de reagentes comprados tanto da Sigma quanto de outros fornecedores. Esse orçamento alternativo foi o utilizado neste trabalho. Nesse orçamento alternativo o preço por reação foi de R\$ 1,61.

ORÇAMENTO DOS REAGENTES DE OUTROS FABRICANTES (20-10-2017)

REAGENTES	QUANTIDADE	CÓDIGO DO PRODUTO	PREÇO DO PRODUTO (R\$)	QUANTIDADE DE REAÇÕES TOTAIS	PREÇO POR REAÇÃO	PREÇO DE 1000 REAÇÕES/REAGENTE
DL - DTT (PROMEGA)	5 g	V3151	R\$ 398,00	266	R\$ 1,50	R\$ 1.496,24
MgCl2 (SIGMA)	1 kg	M8266	R\$ 179,66	340000000	R\$ 0,00	R\$ 0,00
NaCl (LUDWIG)	1 kg	CAS: 7647-14-5	R\$ 60,00	5876543	R\$ 0,00	R\$ 0,01
NP-40 (SIGMA)	1 L	7438S	R\$ 443,00	333000	R\$ 0,00	R\$ 1,33
Sulfato de amônio (LUDWIG BIOTEC)	250 g	CAS:7783-20-2	R\$ 40,00	2625	R\$ 0,02	R\$ 15,24
Tiocianato de guanidina (LUDWIG BIOTEC)	100 g	CAS: 593-84-0	R\$ 115,00	2352	R\$ 0,05	R\$ 48,89
Isopropanol (PRÓ-ANÁLISE)	1 L	1096341000	R\$ 115,81	2380	R\$ 0,05	R\$ 48,66
Acetato de sódio (LUDWIG BIOTEC)	1 kg	CAS: 127-09-3	R\$ 70,00	19241	R\$ 0,00	R\$ 3,64
TRIS BASE (LUDWIG BIOTEC)	500 g	CAS: 77-86-1	R\$ 195,00	198333330	R\$ 0,00	R\$ 0,00
TOTAL					R\$ 1,61	R\$ 1.614,01

Tabela 6 - Orçamento dos reagentes de diferentes fabricantes

FONTE: COSTA (2017)

6. DADOS PARCIAIS

O método TGSA está sendo testado atualmente com outros organismos modelos para validar sua versatilidade. A imagem 10 mostra dados parciais de RNAs extraídos de *Danio rerio* (zebra fish).

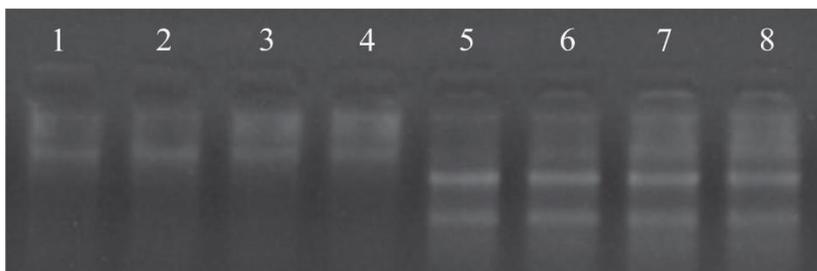


Figura 10 – Eletroforese da extração de RNA de *Danio rerio*. Poços 1 – 4 são extrações de estágio larval de 72 horas; os poços 5 e 6 são extrações de 1 cérebro por extração e os poços 7 e 8 são extrações de 2 cérebros por extração (estágio adulto)

FONTE: COSTA (2017)

Modificações na maceração estão sendo feitas para conseguir uma extração de qualidade do estágio larval. Porém, extrações de RNA do cérebro de *Danio rerio* adulto já foram obtidas com sucesso. O método é sensível o suficiente para extrair RNA de qualidade de apenas 1 cérebro, como evidenciado nos poços 5 e 6.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir dos resultados deste trabalho é possível concluir que:

- O método TGSA é uma ótima alternativa de baixo custo para extração de RNA de alta pureza e qualidade comparável com os kits de colunas cromatográficas comerciais disponíveis no mercado;
- Não é necessário o uso de solventes orgânicos como fenol e clorofórmio para purificação de RNA, sendo que o mesmo é eficientemente purificado por *salting out* com sulfato de amônio;
- O RNA extraído pelo método TGSA é apto para ser utilizado em processos *downstream*;
- O tiocianato de guanidina pode ser utilizado em concentrações 4 vezes menores do que o indicado pela literatura, até o momento, sem perda de eficiência nas extrações

Quanto às perspectivas:

- Estabelecer o número de integridade do RNA (RNA integrity number – RIN) do RNA proveniente do método TGSA
- Tentar diminuir o tempo do protocolo a partir da aplicação do tiocianato de guanidina e o sulfato de amônio sem centrifugação entre ambos os tratamentos;
- Testar o efeito da substituição do DTT por Tioglicerol (atualmente usado em kits da Promega) no nosso protocolo para diminuir ainda mais o valor do mesmo
- Testar o protocolo na extração de RNA de diferentes modelos animais e vegetais.

8. REFERÊNCIAS

ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. **Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding.** *Biochemistry*, v. 23, n. 25, p. 5912-5923, 1984. ISSN 0006-2960.

BURGESS, R. R. **Protein precipitation techniques.** *Methods in enzymology*, v. 463, p. 331-342, 2009. ISSN 0076-6879.

CHEN, C.; OKAYAMA, H. **High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.** *Molecular and cellular biology*, v. 7, n. 8, p. 2745-2752, 1987. ISSN 0270-7306.

CHIRGWIN, J. M. et al. **Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease.** *Biochemistry*, v. 18, n. 24, p. 5294-5299, 1979. ISSN 0006-2960.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. **Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.** *Analytical biochemistry*, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987. ISSN 0003-2697.

COX, R. [103a] **The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids.** *Methods in enzymology*, v. 12, p. 120-129, 1968. ISSN 0076-6879.

FARRELL, R. E. **RNA Methodologies: Laboratory Guide for Isolation and Characterization.** Elsevier Science, 2009. ISBN 9780080884950. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=ERdmQGrAtTQC>>.

FREITAS, S.; SANTOS, J.; PRAZERES, D. **Optimization of isopropanol and ammonium sulfate precipitation steps in the purification of plasmid DNA.** *Biotechnology progress*, v. 22, n. 4, p. 1179-1186, 2006. ISSN 1520-6033.

GLISIN, V.; CRKVENJAKOV, R.; BYUS, C. **Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation.** *Biochemistry*, v. 13, n. 12, p. 2633-2637, 1974. ISSN 0006-2960.

GORDON, J. A. **Denaturation of globular proteins. Interaction of guanidinium salts with three proteins.** *Biochemistry*, v. 11, n. 10, p. 1862-1870, 1972. ISSN 0006-2960.

IMBEAUD, S. et al. **Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces.** Nucleic Acids Research, v. 33, n. 6, p. e56-e56, 2005. ISSN 0305-1048. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gni054>>.

JAVADI, A. et al. **Qualification study of two genomic DNA extraction methods in different clinical samples.** Tanaffos, v. 13, n. 4, p. 41, 2014.

MILLER, S.; DYKES, D.; POLESKY, H. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** Nucleic acids research, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.

NIELSEN, H. The Transcriptional Landscape. In: NIELSEN, H. (Ed.). **RNA: Methods and Protocols.** Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p.3-14. ISBN 978-1-59745-248-9.

PINTO, H. B. **Desenvolvimento de um protocolo de purificação de DNA Plasmidial pela técnica de Salting-out utilizando Sulfato de Amônio.** 2016. Disponível em: <<http://dspace.unipampa.edu.br:8080/jspui/handle/riu/1403>>. Acesso em: 23/10/2017.

SCHELLMAN, J.; SIMPSON, R.; KAUZMANN, W. **The kinetics of protein denaturation. II. The optical rotation of ovalbumin in solutions of guanidinium salts.** Journal of the American Chemical Society, v. 75, n. 21, p. 5152-5154, 1953. ISSN 0002-7863.

SELA, M.; ANFINSEN, C. B.; HARRINGTON, W. F. **The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure.** Biochimica et biophysica acta, v. 26, n. 3, p. 502-512, 1957. ISSN 0006-3002.

ZHOU, H. X. **Interactions of macromolecules with salt ions: an electrostatic theory for the Hofmeister effect.** Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, v. 61, n. 1, p. 69-78, 2005. ISSN 1097-0134.