



AVALIAÇÃO QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE TÉCNICAS ALCALINAS E PERMANENTES DE EXTRAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE OVINOS

Dévanny Weller Ferreira Menassa, Amanda Silva de Azevedo, Thiago da Silva Corrêa, Aline Pacheco, Celia Raquel Quirino

A extração de DNA é a primeira etapa a ser realizada nos estudos de genética molecular e no processo de identificação genotípica. Este trabalho teve o objetivo de avaliar a viabilidade de amostras de sêmen armazenadas a 4°C para extração de DNA utilizando técnica alcalina e permanente. Para as extrações de DNA foram utilizadas amostras de sêmen de cinco ovinos. Após a coleta de sêmen foram realizadas as extrações de DNA e posteriormente as amostras foram refrigeradas a 4°C por 48 e 96 horas, e 1 e 2 meses. Para cada período de tempo foram testados três protocolos utilizando extração alcalina rápida, e dois utilizando extração permanente. Na extração alcalina foram utilizadas solução de lise (192,5 mM de NaOH) e solução neutralizante (200 mM de HCL e 100 mM de Tris HCL), sendo o primeiro protocolo feito com sêmen total, o segundo com sêmen centrifugado e o terceiro com sêmen tratado com citrato de sódio. Na extração permanente foi utilizada a proteinase K, sendo que no primeiro protocolo o processo de purificação com etanol a 70% se repetiu por duas vezes e após este processo, as amostras não foram ao freezer, no segundo protocolo a purificação com etanol a 70% acontece somente uma vez e após, as amostras foram ao freezer. Após a extração, as amostras foram analisadas qualitativa e quantitativamente através do espectrofotômetro (nanodrop2000®). Para comprovar a eficiência da extração, as amostras foram submetidas à amplificação do DNA pela técnica da PCR, utilizando o locus IRNA63. O tipo de protocolo influenciou a concentração de DNA extraído ($P < 0,005$). O protocolo alcalino rápido com sêmen total ($718,48 \pm 207,51 \text{ ng}/\mu\text{l}$) apresentou a maior média, seguido pelo protocolo alcalino rápido com sêmen centrifugado ($631,18 \pm 275,37 \text{ ng}/\mu\text{l}$), e protocolo alcalino com citrato de sódio ($384,98 \pm 372,97 \text{ ng}/\mu\text{l}$), os protocolos permanentes foram os que obtiveram menor concentração ($136,83 \pm 164,61$ e $90,27 \pm 92,28 \text{ ng}/\mu\text{l}$). Com relação à pureza proteica e de sais os protocolos permanentes apresentaram resultados maiores ($1,42 \pm 0,23$ e $0,70 \pm 0,24$, respectivamente) que os protocolos alcalinos ($1,00 \pm 0,16$ e $0,39 \pm 0,24$, respectivamente), indicando amostras mais puras para os protocolos permanentes. Conclui-se que quantidades satisfatórias de DNA podem ser conseguidas utilizando sêmen fresco ou refrigerado por até 2 meses, empregando-se técnicas alcalinas ou permanentes, porém para extrações mais puras recomenda-se utilizar as técnicas permanentes.

Palavras-chave: Extração de DNA, Técnica alcalina, Técnica permanente.

Instituição de fomento: CNPq, FAPERJ, UENF.