

COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA NAS BACTÉRIAS *E. COLI* E *PSEUDOMONAS SPP*

Comparison of DNA extraction protocols in bacteria *E. coli* and *Pseudomonas spp*

Felipe de Almeida Bonatto^a. Heliene Ana Moreno Breve^b. Erik Cendel Saenz Tejada^c

^{a,b}Estudante do curso de Biomedicina do Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas.

^cBiólogo, Doutor em ciências área Bioquímica, e pós-doutor em Biotecnologia.

Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas- FMU. Avenida Santo Amaro, 1239, 04505-002, Vila Nova Conceição - São Paulo – SP

RESUMO

O diagnóstico de bactérias enteropatogênicas através da extração de DNA, esta sendo uma alternativa no diagnóstico de doenças microbianas. Este trabalho tem o intuito de elaborar um protocolo de extração de DNA das bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp*. Assim foi realizado algumas alterações nos protocolos de Khoodoo e Sambrook, além da utilização de Proteinase K e lavagens com clorofórmio, foi feita a quantificação do material extraído de ambas as bactérias. Os resultados mostraram a obtenção de DNA de boa qualidade em ambas as bactérias quando tratadas com proteinase K (PK) e clorofórmio, denotando que o protocolo 1 foi mais eficiente para a extração de DNA plasmidial de *Pseudomonas spp*, e o protocolo 2 foi mais eficiente para a extração de DNA genômico de *Escherichia coli*.

Palavras-chave: DNA, *E. coli*, *Pseudomonas*, extração, plasmidio, genômico.

ABSTRACT

The diagnosis of enteropathogenic bacteria, by means of extracting the DNA, is seen as an alternative for the diagnosis of microbial diseases. This work aims to create a protocol for DNA extraction from the bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas spp*. Thus changes has been done in the protocols of Sambrook and Khoodoo besides the use of Proteinase K and chloroform washing. Quantification of the extracted material from both bacteria has was done. The results showed good quality DNA obtained from both bacteria, when treated with Proteinase K (PK) and chloroform, denoting that protocol 1 was more efficient for the extraction of plasmid DNA from *Pseudomonas spp*, and protocol 2 was more efficient for the extraction of genomic DNA of *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

Os agentes etiológicos das infecções do trato urinário em geral são microrganismos de crescimento rápido. *Escherichia coli*, *Enterococcus spp*, *Klebsiella-Enterobacter spp*, *Proteus spp*, e *Pseudomonas spp*. representam a maioria dos isolamentos, tanto em pacientes hospitalizados quanto em ambulatoriais. Até 50% do total de infecções adquiridas em hospitais gerais são urinárias. A *Escherichia coli* é o microrganismo mais freqüente nas infecções não complicadas do trato urinário.²

A parede celular das células procarióticas sempre foi uma grande vantagem para esses organismos, pois ela apresenta diversas características como elasticidade, resistência a pressão, a altas temperaturas e a valores extremos de pH. Essa característica faz com que a quebra da parede celular nas gram-positivas apresente maior dificuldade, que acaba por acarretar que as técnicas utilizadas para a quebra desta parede sejam muitas vezes trabalhosas, como a ruptura celular por sonicação, auxílio de enzimas tornando as técnicas mais custosas e demoradas.⁴

A coloração diferencial de Gram divide as bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas, sendo o grupo das Gram negativas em maior número para a fitopatologia. A reação das bactérias à técnica de Gram é relacionada diretamente à composição química, estrutural e a permeabilidade da parede celular. A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída de uma camada espessa composta por peptidoglicano, responsável pela sua rigidez, já nas gram-negativas, a camada de peptidoglicano é mais fina, relativamente, que conseqüentemente confere uma maior fragilidade.⁷

A obtenção do DNA genômico pelos métodos convencionais precisa-se da lise celular e alguns procedimentos que tornam o DNA disponível para a extração. Para isso, existem vários passos laboratoriais necessários que pode tornar o procedimento longo e fazendo com que o rendimento e a pureza do material nem sempre sejam adequados e que as concentrações inicialmente estimadas necessitem de reajustes para a seqüência do protocolo. Além disso, a excessiva manipulação com a amostra pode ocorrer a degradação do DNA em vários níveis.¹

As várias metodologias descritas para extração do DNA bacteriano são normalmente demoradas e de alto custo. Assim o presente trabalho visa a obtenção de um protocolo de extração de DNA de boa qualidade das bactérias *Escherichia coli* e *Pseudomonas*.

OBJETIVO

Padronizar um protocolo de extração de DNA das bactérias *E. coli* e *Pseudomonas spp* de boa qualidade com eficiência e alto rendimento, com reagente de baixo custo e de uso rotineiro de laboratório.

MATERIAIS E METODOS

Os métodos a seguir se resume com a preparação da cultura PBS das bactérias, obtenção do pellet bacteriano, extração com os dois protocolos de extração de DNA, a visualização das amostras em gel de agarose a 1% e a ultima etapa a quantificação das amostras obtidas.

Preparação da cultura

O trabalho foi realizado com duas culturas das bactérias *E. coli* e *Pseudomonas spp* em meio liquido para a preparação de *pellet* bacterianos, que foram conservados a -20°C para a fase de extração de DNA.

Protocolo 1 - Extração com SDS:

Este protocolo de extração indicado por Khoodoo e col. (2002) Modificado.

O pellet foi ressuspenso em 1000 µL de solução PBS e 2 µL de EDTA. Neste foi adicionado 60 µl de SDS 10%, e misturado com leve agitação e incubado à 60°C durante 10 min, resfriado à temperatura ambiente. Neste foi adicionado 0,65 mL de fenol-clorofórmio, e agitado vigorosamente, centrifugado à 10.000 rpm durante 5 min, transferindo 500 µL da fase aquosa para outro tubo e realizado uma nova extração 500 µL fenol-clorofórmio, da fase aquosa foram retirados 500 µL e passado para um tubo novo e neste foi adicionado 10 µl de NaCl 5M, foi adicionado 300 µl de isopropanol gelado, foi novamente

centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min e o precipitado de ácidos nucleicos lavados com etanol 70%. O pellet foi seco e foi acrescentado 50 μ L de H₂O.

Em seguida foi feito uma eletroforese em gel de agarose a 1% com as amostras e o gel teve duração de 1 hora.

Foi feito um nova extração do mesmo protocolo, mas a diferença é que desta vez a eletroforese teve uma duração de 30 minutos.

Protocolo 2 - Extração com adição de SDS e Proteínase K:

Este protocolo de extração indicado por Sambrook e col. (1989) modificado.

O pellet foi ressuspensionado em 567 μ L de TE, em seguida foi adicionado 30 μ L de SDS 10 % e 3 μ L de proteinase K. As células com as soluções foram mantidas à 56°C por 30 minutos sem agitação, em seguida foram realizadas duas extrações com 500 μ L fenol-clorofórmio, da fase aquosa foram retirados 500 μ L e colocada em outro microtubo novo de 1,5 mL, neste foi adicionado 10 μ L de solução NaCl a 5 M e precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado. O DNA foi incubado à -20°C por 10 minutos, em seguida centrifugado à 12000 \times g por 10min; o precipitado foi lavado com álcool 70%. O pellet foi seco e foi acrescentado 50 μ L de H₂O.

Em seguida foi feito uma eletroforese em gel de agarose a 1% com as amostras e o gel teve duração de 1 hora.

Foi feito uma segunda extração, mas com algumas mudanças no protocolo, após colocar o etanol absoluto gelado, a amostra não foi submetido a incubação à -20°C por 10 minutos, e eletroforese teve duração de 30 minutos.

Quantificação do DNA extraído:

Foi feita a quantificação dos produtos extraídos de ambas as bactérias com os diferentes protocolos, o equipamento utilizado foi o espectrofotômetro e depois comparamos os resultados obtidos pela quantificação.

RESULTADOS

Os resultados mostram que utilizando ambos os protocolos foi possível extrair DNA bacteriano. Assim o protocolo 1 foi o mais eficiente para a extração de DNA genômico para a bactéria *Escherichia coli* segundo mostrado na figura 1 canaleta 1. Além disso, este protocolo se mostrou eficaz na extração de DNA total na bactéria *Pseudomonas spp.* O protocolo 2 se mostrou mais eficiente na extração de DNA plasmidial da bactéria *Pseudomonas spp.* segundo mostrado na canaleta 4, mas não foi eficiente para extrair DNA em *Escherichia coli*.

O segundo gel que podemos observar na figura 2 foi possível extrair DNA genômico de *Escherichia coli* no protocolo 1, mas não foi eficiente na extração de DNA plasmidial, e com o protocolo 2 também foi possível extrair DNA genômico de *Escherichia coli*, e também não foi possível extrair DNA plasmidial.

O protocolo 2 pode-se observar que foi possível extrair DNA genômico e plasmidial de *Pseudomonas spp.*, porém o DNA genômico está em baixa quantidade, o protocolo 2 podemos observar que foi possível extrair DNA genômico de *Escherichia coli*, mas não foi eficiente para extração de DNA plasmidial.

Segundo as análises feitas sobre a figura 2, podemos concluir que o melhor protocolo de extração de DNA foi através do protocolo 1 (Khodoo) de DNA total de *Pseudomonas spp.*, e o protocolo 2 foi o melhor na extração de DNA genômico em ambas as bactérias.

O resultado da quantificação das amostras obtidas demonstradas na Tabela 1 foram de acordo com a quantidade de material genético, as amostras em maior volume foram do protocolo 1 em *Pseudomonas spp.* com a quantidade de 655µg/µL e do protocolo 2 em *Escherichia coli* com a quantidade de 950µg/µL.

Com base sobre esses resultados podemos comprovar que as

amostras obtidas contem grande quantidade de material genético extraído de ambas as bactérias, os resultados da quantificação pode ser visto na Tabela 1.

CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos nos géis de agarose e na quantificação das amostras, podemos concluir que foi possível extrair DNA em ambos os protocolos, mas alguns protocolos são mais específicos para cada tipo de DNA que são genômico e plasmidial.

O protocolo 1 foi o mais eficiente para extração de DNA plasmidial da bactéria *Pseudomonas spp* e no protocolo 2 se mostrou mais eficiente na extração de DNA genômico da bactéria *Escherichia coli*.

A quantificação das amostras foram boas no protocolo 1 em *Pseudomonas spp* e no protocolo 2 em *Escherichia coli*, mas ambos os protocolos foi possível extrair o material genético de ambas as bactérias, o resultado da quantificação condiz com os resultados obtidos através dos géis de agarose.

DISCUSSÃO

A quantificação das amostras obtidas através das extrações de ambas as bactérias demonstraram ótimos resultados, mas o equipamento não diferencia DNA, RNA e proteínas, o resultado alto de 655µg/µL do protocolo 1 na extração da amostra de *Pseudomonas* é devido á grande quantidade de RNA que podemos observar nas figuras 1 e 2.

A alta quantidade da amostra de *Escherichia coli* na quantificação que é de 950µg/µL pode ser pela alta quantidade de RNA que podemos observar nas figuras 1 e 2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUENO, Valquiria. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. [online]. 2004, vol.26, n.4, pp. 233-234. ISSN 1516-8484.
2. FERREIRA, L.E. et al. Painel molecular para detecção de microrganismos associados à sepse. Revista Brasileira de Terapia Intensiva. v. 23, n.1, 2011.
3. KHOODOO, M. H. R.; ISSACK, M. I.; JAUFEEERALLY-FAKIM, Y. Serotyping and RAPD profiles of Salmonella enterica isolates from Mauritius. Letters in Applied Microbiology. v. 35, p. 146-152, 2002.
4. NOGUEIRA, C.A.M. et al. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. Revista Panamericana de Infectologia. v. 6, n. 2, p. 35-38, 2004.
5. ODALIA-RÍMOLI, et al. Biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local. Revista Internacional de Desenvolvimento Local, v. 1, n. 1, p. 21-30, 2000.
6. ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. Summa phytopathol. v. 34, n. 3, 2008.
7. SALTON M.R.J. Studies of the bacterial cell wall. IV. The composition of the cell walls of some Gram-positive and Gram-negative bacteria. Biochim. et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 10, n.4, p.512-523, 1953
8. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.
9. SAMBROOK, J., RUSSEL. D. W. Molecular cloning: a Laboratory manual, 3. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.

10. SARTORETTO, L.M., FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. *Unoesc & Ciência – ACET*, Joaçaba, v. 1, n. 2, p. 155-162, 2010.
11. SCHENBERG, Ana Clara G. Elementos de Engenharia Genética. In: BORZANI, W. et al. *Biologia Industrial: Fundamentos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
12. SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. *Biologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria: Classificação de Bactérias Fitopatogênicas utilizando técnicas baseadas em DNA*. Caxias do Sul. 2002.
13. TIERNEY, Amy. DNA in Crime Solving. In: BORÉN, Aluizio, SANTOS, Fabrício Rodrigues, ALMEIDA, Márcia Rogéria. *Biologia de A à Z*. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2003.
14. WATMAN BIOSCIENCE. Preparation of Sample DNA for Downstream Analysis. Folheto explicativo. Estados Unidos/Canadá, 2008.
15. WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

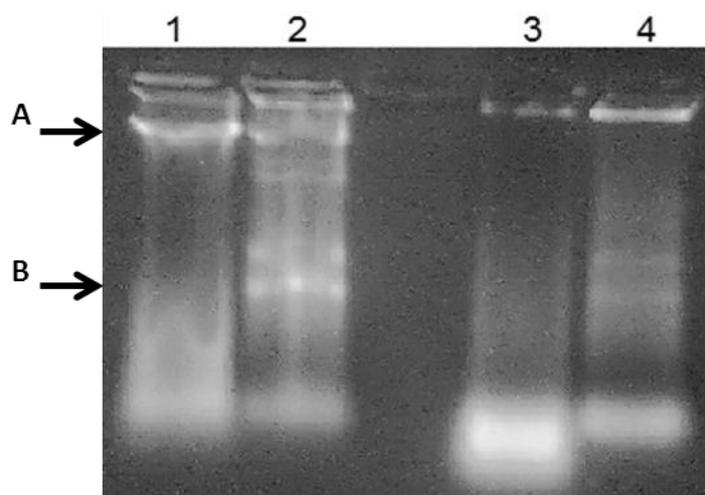


Figura 1 – Análise comparativa da extração de DNA através de eletroforese em gel de agarose ao 1%, em (1) *E. coli*, (2) *Pseudomonas* spp, através do protocolo 1 e, (3) *E. coli*, (4) *Pseudomonas* spp através do protocolo 2. Em (A) DNA genômico e (B) DNA plasmidial.

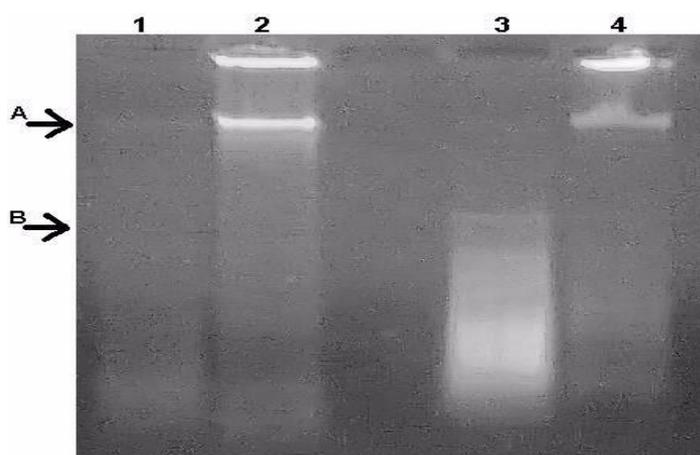


Figura 2 – Análise comparativa da extração de DNA através de eletroforese em gel de agarose ao 1%, em (1) *E. coli*, através do protocolo 1, (2) *E. coli*, através do protocolo 2, (3) *Pseudomonas* spp, através do protocolo 1, e (4) *Pseudomonas* spp, através do protocolo 2. Em (A) DNA Genômico e (B) DNA plasmidial.

Bactéria	Quantificação	
	Protocolo 1	Protocolo 2
<i>E. Coli</i>	260µg/µL	950µg/µL
<i>Pseudomonas spp</i>	655µg/µL	335µg/µL

Tabela 1 – Análise comparativa da quantificação de DNA bacteriano no espectrofotômetro a 260nm.