

Medicina Veterinária

OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE FEZES DE LEITÕES

Larissa Thalia Costa Manfro - 6º módulo de Medicina Veterinária - Departamento de Medicina Veterinária/DMV - Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária/FZMV

Glei dos Anjos de Carvalho Castro - Animalnutri

Pedro Henrique Pereira - 8º módulo de Medicina Veterinária - Departamento de Medicina Veterinária/DMV - Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária/FZMV

Sibely Aiva Flores - Mestranda em Fisiologia e Metabolismo animal do PPGCV, UFLA

Elaine Maria Seles Dorneles - Professora Associada do Departamento de Medicina Veterinária (DMV), UFLA – Contato: elaine.dorneles@dmv.ufla.br - Orientadora - Orientador(a)

Resumo

A extração de DNA é considerada uma das etapas fundamentais para execução de técnicas de biologia molecular bem sucedidas, pois é a base para o processamento dessas. A extração de DNA adequada está relacionada ao grau de pureza do material obtido, uma vez que a presença de contaminantes, como proteínas, sais, RNA, lipídeos, substâncias residuais, comprometem negativamente as análises posteriores, gerando resultados inconsistentes. Diante disso, visando otimizar um protocolo de extração de DNA total de amostras de fezes de suínos, para identificação de microbiota, foi realizada a extração de DNA por meio de três protocolos distintos: a utilização exclusiva do Kit Wizard Promega e duas adaptações, baseadas na literatura. Primeiramente, o material foi processado com o Kit Wizard Promega, com alterações para a amostra. Em seguida, foram avaliados dois protocolos 1) a associação de um pré-tratamento com esferas de vidro e uso de tampão de lise TRIS EDTA triton lisozima e homogeneização em vortex a cada 5 minutos durante incubação 2) esferas de vidro com maceração prévia das fezes após lise com tampão Tris HCL 1,5M, EDTA, Triton e Lisozima tempos distintos de lise, e maior período de incubação em banho maria. As amostras extraídas foram quantificadas em Nanodrop e avaliadas quanto à integridade em gel de agarose 1%. Após a escolha do método mais adequado, este também foi submetido a diferentes tempos de incubação e centrifugação. A utilização do Kit Wizard seguindo protocolo para extração de plantas adaptado mostrou baixo teor de purificação. Os protocolos 1 e 2 apresentaram melhor desempenho, sendo que a associação do Kit Wizard ao uso de esferas de vidro sem maceração foi superior. Isto pode estar relacionado ao aumento da superfície de contato entre a amostra e tampão de lise incubado na temperatura ótima, promovida pelas esferas de vidro. Este protocolo, com tempos de incubação e centrifugação aumentados, permitiu a obtenção de um produto com concentração de DNA adequada, e relações A280/A260 e A260/A230, dentro da faixa considerada ótima, entre 1,8 e 2,2 mostrando a qualidade da purificação. Entretanto, ainda apresentou alto grau de impurezas detectadas pelo nanodrop, sendo necessário uma adaptação utilizando uma etapa adicional de bead-beating. Por fim, a otimização da extração de DNA associando protocolo de kit Wizard, com modificações, a bead-beating permitiu a adequação da técnica e obtenção de DNA em concentração e qualidade adequadas.

Palavras-Chave: Diagnóstico, patógenos, suínos.

Instituição de Fomento: Universidade Federal de Lavras

Link do pitch: <https://youtu.be/l2a8ldRFFB4>