

Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR

César Milton Baratto*

Fernanda Megiolaro**

Resumo

São várias as metodologias já descritas para extração do DNA genômico bacteriano, porém as mesmas são normalmente demoradas e com muitas etapas, aumentando a probabilidade de falhas devido à excessiva manipulação. O kit comercial FTA Classic Card (Whatman) proporciona menor tempo e menos etapas para a extração do DNA, entretanto, há relatos de dificuldades na sua utilização em alguns casos para amplificação por PCR. O objetivo deste trabalho foi de realizar comparação qualitativa de DNAs bacterianos obtidos por 4 diferentes técnicas de extração frente sua utilização em RAPD-PCR. Os testes para extração de DNA foram realizados com bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, enfatizando a potencialidade de interferência da qualidade dos DNAs nos resultados. As metodologias de extração de DNA comparadas foram: com utilização de apenas de SDS para lise celular, a segunda com adição de SDS e proteinase K, a terceira por choque térmico e a última pelo método do cartão FTA Classic Card. As técnicas foram testadas em duas bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* e duas Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Pode-se observar que as extrações de DNA das bactérias Gram-positivas, possivelmente por possuírem parede celular mais espessa, apresentaram amplificações somente com a utilização dos protocolos de extração com adição de proteinase K, enquanto o método com o Kit FTA Classic Card não apresentou resultados uniformes. De forma que o método de extração de DNA interferiu no produto final amplificado, o que pode interferir na análise e interpretação dos resultados.

Palavras-chave: Extração de DNA. RAPD-PCR. Genética de microrganismos. FTA.

1 INTRODUÇÃO

Desde que James Watson e Francis Crick propuseram que o material genético era o ácido desoxirribonucléico – DNA, sendo este uma dupla hélice, constituída por uma estrutura com duas fitas mantidas principalmente por pontes de hidrogênio (GLICK; PASTERNAK, 2003), a área da biologia molecular evoluiu muito. De tal forma que a engenharia genética proporcionou a possibilidade de amplificar sequências individuais de DNA, com a reação em cadeia da polimerase, ou PCR (*Polimerase Chain Reaction*), desenvolvida na década de 1980 (MULLIS; FALOONA, 1987) e a caracterização de suas propriedades, com a determinação da sua sequência de nucleotídeos com precisão.

Isso tem proporcionado um grandioso progresso no conhecimento básico da genética em que a clonagem de um dado fragmento de DNA permite que a partir de uma molécula sejam produzidas quantidades ilimitadas desta (SCHENBERG, 2001). Além disso, a própria descrição de sequências

* Biólogo Molecular; Professor e Pesquisador da Universidade do Oeste de Santa Catarina *Campus* de Videira; Doutor em Ciências; Rua Paese, Bairro Universitário, 89560-000, Videira, SC; Cesar.baratto@unoesc.edu.br

** Biotecnóloga Industrial – Universidade do Oeste de Santa Catarina *Campus* de Videira; Rua Paese, Bairro Universitário, 89560-000, Videira, SC; fermegiolaro@gmail.com

completas do genoma, suas potenciais informações com o transcriptoma e proteoma, abre novas possibilidades em termos de aplicação tecnológica (HIRATA et al., 2006).

Outra aplicação, não menos importante, é a utilização e a classificação de microrganismos, seja em aspectos clínicos, fitopatológicos ou biotecnológicos (SARTORETTO; FARIAS, 2010). Essa possibilidade utilizando métodos para discriminação de gêneros, espécies ou estirpes de microrganismos, onde esses métodos moleculares apresentam várias vantagens sobre os métodos fenotípicos ou bioquímicos (QUINTAES et al., 2002; GERHARDT, 1994).

Um das técnicas mais utilizadas para a diferenciação de microrganismos e a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Os primeiros estudos que utilizaram esses métodos foram feitos em 1990 e a partir de então tem sido amplamente utilizados na diferenciação de microrganismos, estudos de diversidade genética e resolução de grupos taxonômicos (WELSH; MCCLELLAND, 1990). Esta técnica é baseada em uma reação de PCR, na qual se utiliza iniciadores de sequências aleatórias com cerca de 10 nucleotídeos. A grande vantagem desta técnica é que ela pode ser utilizada em qualquer tipo de bactéria e não há necessidade de conhecimento prévio do genoma (SERAFINI et al., 2002).

Segundo Serafini et al. (2002), o resultado da RAPD-PCR pode então ser visualizado por eletroforese, permitindo a comparação de diferentes isolados bacterianos por meio da identificação do tamanho dos fragmentos. O peso molecular e o número de bandas variam de acordo com a amostra utilizada e a uniformidade de bandas em organismos relacionados (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Assim, podem-se comparar os perfis obtidos para diferenciar linhagens ou espécies, sendo que há bandas presentes em uma determinada espécie ou grupo, mas está ausente em espécies relacionadas.

Entretanto, a grande maioria dessas técnicas apresentam uma necessidade comum: que o material genético dos organismos em questão esteja purificado (GERHARDT, 1994), assim, são inúmeras as metodologias para extração de DNA, no entanto independentemente do método utilizado, a finalidade dos protocolos de extração é resultar em um DNA de alta qualidade, em quantidade, de forma rápida e eficiente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A extração orgânica é a mais utilizada, e consiste na separação do DNA da célula a partir da lise celular com SDS (dodecil sulfato de sódio), e a extração com fenol-clorofórmio, que vai separar DNA e proteínas, e seguida de precipitação com álcool, há ainda alguns protocolos que utilizam enzimas para lise mais completa das células, no entanto, são mais demoradas e dividida em diversas etapas, o que aumenta a possibilidade de erro e baixa qualidade do DNA extraído (ROSA, 2008).

Outra metodologia mais simples e rápida utilizadas em alguns casos, principalmente em amplificação com PCR, onde não há exigências quanto a quantidade e a qualidade do DNA, é a extração térmica, em que a solução contendo as células bacterianas são submetidas a choques térmicos para a lise celular e liberação do material genético (SAMBROOK et al., 1989).

Uma nova técnica desenvolvida e obtida comercialmente é a extração feita por meio do método de impregnação de DNA de um cartão, que é o princípio de funcionamento do papel FTA Classic Card da Whatman, que possibilita a redução de etapas de manipulação e tempo de extração. O cartão FTA constitui-se em uma base de celulose impregnado de agentes químicos que impedem a degradação do DNA, onde a purificação de DNA a partir deste é realizada com solventes que fazem parte do Kit (Watman Biosci). Embora outras empresas estejam buscando tecnologia semelhante, não há outro fornecedor, sendo um produto fabricado exclusivamente por esta empresa.

Em bactérias, um fator adicional que contribui para a complexidade da extração do DNA, reside nas diferenças quanto à composição da parede celular das mesmas. Desse modo, os diferentes protocolos de extração de DNA devem considerar essa importante diferença estrutural bacteriana, principalmente ao planejar a estratégia de obtenção de ácidos nucleicos celulares. Nessa direção, diferentes metodologias são descritas na tentativa de obtenção de grande quantidade de DNA a partir de bactérias Gram-positivas (G+) e Gram-negativas (G-), com maior ou menor sucesso (NOGUEIRA et al., 2004).

A comparação de protocolos para as bactérias de características diferentes tenciona uma otimização da obtenção do DNA extraído, ou seja, busca um protocolo de extração que possa ser usado para ambas as bactérias sem prejuízos à amplificação em PCR, e ao mesmo tempo rápido e eficiente. Dessa forma, o presente trabalho buscou comparar a qualidade de DNAs das bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* sendo Gram-negativas e *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* como Gram-positivas, obtidos por quatro diferentes técnicas de extração para a utilização em RAPD.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade do Oeste de Santa Catarina, *Campus Videira*.

2.1 MICRORGANISMOS E CULTIVO DAS CÉLULAS

As bactérias utilizadas para o desenvolvimento do trabalho foram: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Estas bactérias foram advindas do estoque de Cepas do Laboratório de Biologia Molecular e Microbiologia, e obtidas a partir de culturas puras congeladas.

Para confirmação das espécies das cepas, estas foram inoculadas em meio seletivo, em que utilizou-se EMB – Eozina Azul de Metileno (OXOID) para *E. coli*, Hambach (MERK) para *S. Typhimurium*, Baird Parker (DIFCO) para *S. epidermidis* e *S. aureus*, e cultivadas por aproximadamente 12h em estufa à 37°C. Posteriormente foi realizada a coloração de Gram.

As colônias típicas para cada espécie bacteriana foram inoculadas em caldo BHI e cultivadas por 16h sob agitação. As culturas foram então utilizadas para a extração de DNA frente aos diferentes procedimentos.

2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA

Foram utilizados 4 diferentes tipos de extração de DNA bacteriano descritos na literatura para a posterior análise de sua qualidade, frente ao seu perfil de amplificação a partir da técnica de RAPD-PCR.

2.2.1 Procedimento 1 - Extração com SDS

Este método de extração foi obtido a partir de algumas modificações do procedimento indicado por Khoodoo et al. (2002).

As células obtidas a partir de 1,5 mL de cultura foram precipitadas por centrifugação, o *pellet* foi ressuspensão em 0,75 mL de solução salina-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 em vórtex, centrifugado à 10.000 rpm durante 5 min, transferindo 500 µL da fase aquosa (superior) para outro tubo e realizado uma nova extração 500 µL fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), da fase aquosa (superior) foram retirados 500 µL e passado para um tubo novo e neste foi adicionado 10 µL de NaCl 5M (concentração final de 0,1 M) e os ácidos nucléicos precipitados com dois volumes de etanol absoluto gelado, foi novamente centrifugar a 10.000 rpm durante 10 min e o precipitado de ácidos nucléicos lavados com etanol 70%, secou a temperatura ambiente e foi dissolvido em 100 µL de TE e tratado com 2 µL de RNase H (10 mg.mL⁻¹). Uma alíquota deste DNA foi checado por eletroforese em gel de agarose.

2.2.2 Procedimento 2 - Extração com adição de SDS e Proteínase K

Este procedimento de extração foi de acordo com Sambrook et al. (1989) seguindo algumas sugestões dadas por Jin et al (2006).

Após o cultivo, 1,5 mL da cultura de cada tipo bacteriano foi centrifugado à 12000×g por 2 min, o *pellet* foi ressuspensão em 567µL de TE, em seguida foi adicionado 30 µL de SDS 20 % (dodecil sulfato de sódio) e 3 µL de proteinase K (2mg/mL). As células com as soluções foram mantidas à 37°C por 2 horas sem agitação, em seguida foram realizadas duas extrações com 500 µL fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), da fase aquosa (superior) foram retirados 500 µL e colocada em outro microtubo novo de 1,5 mL, neste foi adicionado 10 µL de solução NaCl a 5 M (para uma concentração final 100mM) e precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado. O DNA foi incubado à -20°C por 2h, em seguida centrifugado à 12000×g por 10min; o precipitado foi lavado com álcool 70% e ressuspensão em 100 µL de TE e tratado com 2 µL de RNase H (10 mg.mL⁻¹) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Uma alíquota deste DNA foi checado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% para quantificação.

2.2.3 Procedimento 3 – Extração Térmica

Novamente, como nos procedimentos anteriores 1,5 mL da cultura foi precipitada por centrifugação, entretanto as células foram lavadas com água ultrapura (Milli-Q) e novamente ressuspensas em 150mL de água ultrapura. Esta foi colocado em banho fervente por 5 min em seguida levada ao banho de gelo por mais 5 min. Procedimento foi repetido mais uma vez e depois centrifugado à 10.000 rpm por 10 min, ao final deste processo foi retirado 100 µL do sobrenadante e descartado o precipitado (ROWLANDS et al, 2006).

2.2.4 Procedimento 4 – Extração de DNA pelo método do cartão Whatman FTA (Classic Card)

Foi aplicado 5-10 µL de cultura de bactéria sobre o papel FTA, aguardou-se a secagem, retirado o disco colocou-se em um tubo de 0,5 mL, foi adicionado 100 µL do reagente de purificação, incubado por 5 min, à temperatura ambiente com moderadas agitações repetindo este processo uma vez, em seguida foi adicionado 200 µL de tampão TE para o tubo e incubado por mais 5 min, e repetindo

este passo, o disco foi seco à temperatura ambiente. Dois milímetros do cartão foram utilizados para cada reação de amplificação, conforme indicação do fabricante (WATMAN BIOCENCE, 2008).

2.3 TÉCNICA DE RAPD-PCR

Foi utilizada para análise qualitativa dos DNAs extraídos pelas diferentes procedimentos a técnica de RAPD com o *primer* de RAPD OPB 17 (AGGGAACGAG). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador HBSP02110 (Thermo Eletron[®]), contendo volume final de 25 µL (Tabela 1). Para a padronização das reações, foi preparado um *mix* com quantidades suficientes para todas as amostras e este dividido em alíquotas para cada reação. A programação utilizada para a reação de RAPD teve as seguintes condições: 94°C por 4 min, 37°C por 4 min, 72°C por 4 min, 4 ciclos, 94°C 30 seg, 37°C por 1min, 72°C por 2 min, 35 ciclos, por fim 72°C por 10 min 04°C por 10 min.

Quando necessário as amostras de DNA foram diluídas com água ultra pura para equiparar a concentração do mesmo, enquanto as reações utilizando a extração térmica foram utilizados 5µL de amostra.

Tabela 1– Componentes das reações de amplificação de DNA pelas técnicas de RAPD

Componentes	Quantidades µL	Concentração *
Tampão de reação	2,5	10x
CaCl ₂	1,5	50 mM
dNTPs	2,0	1mM
DNA molde	0 – 5,0	25 ng/µl
# OPB17	2,0	25 pmol
Taq DNA-polimerase	0,2	2,5 U/µl
H ₂ O ultra-pura	Até completar 25µl	
Final	25	

* Indicação das quantidades utilizadas nas reações e concentrações dos reagentes.

Fonte: os autores.

2.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos das reações foram analisados a partir de eletroforeses em gel de agarose, nas concentrações de 1,0%, em tampão TAE 1x, no gel foi adicionando brometo de etídeo para a concentração final de 0,5 µg/ml. Após a eletroforese, os géis foram visualizados e fotodocumentados sob luz ultravioleta, com o sistema imagem Photo Capt Software version 12.5 for Windows (Vilber Lourmat[®]). Neste programa também foram efetuadas as análises dos géis para comparações dos tamanhos moleculares dos produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala do marcador Ladder 100 (Luwing Biotec[®]), assim como a análise por comparação dos padrões de amplificação entre as amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os avanços e estudos de novas técnicas moleculares voltadas a detecção, identificação ou caracterização microbiológica, a tipagem molecular tem se difundindo amplamente, assim, me-

tecnologias baseada em PCR para amplificação de pequenas quantidades de DNA alvo foi desenvolvida com sucesso, conduzindo uma revolução nas técnicas de diagnóstico laboratorial. Apesar do enorme avanço na detecção de agentes infecciosos por tais métodos, algumas limitações foram evidenciadas. Entre elas, a co-extração de fatores inibitórios, bem como as diferenças intra e interespecíficas que interferem na extração do DNA genômico bacteriano (NOGUEIRA, 2004).

Com nossos resultados, as extrações com a metodologia em que se utilizou apenas o SDS para lise celular e da membrana (procedimentos 1), apresentou um rendimento de DNA de aproximadamente 1 µg para as bactérias Gram positivas e 2 µg para as Gram negativas, enquanto a metodologia com SDS e proteinase K (procedimentos 2), apresentou um rendimento de DNA de aproximadamente 3 µg para as bactérias Gram positivas e 5 µg para as Gram negativas. O resultado demonstra que a extração utilizando a proteinase K apresenta um rendimento claramente maior que a metodologia com apenas SDS. A extração em que se utilizou o choque-térmico (procedimento 3), apresentou um rendimento de aproximadamente apenas 100 ng, já a extração com o kit FTA, o DNA fica impregnado no cartão, assim, não sendo possível sua análise em gel de agarose.

Dessa forma, as extrações que apresentaram melhores resultados quantitativos foram os que utilizaram solventes orgânicos, com fenol e clorofórmio, assim, os DNAs com quantidades e concentrações maiores foram diluídos em água ultra pura, para que ficassem com concentrações de DNA semelhantes, como forma de padronização desta variável.

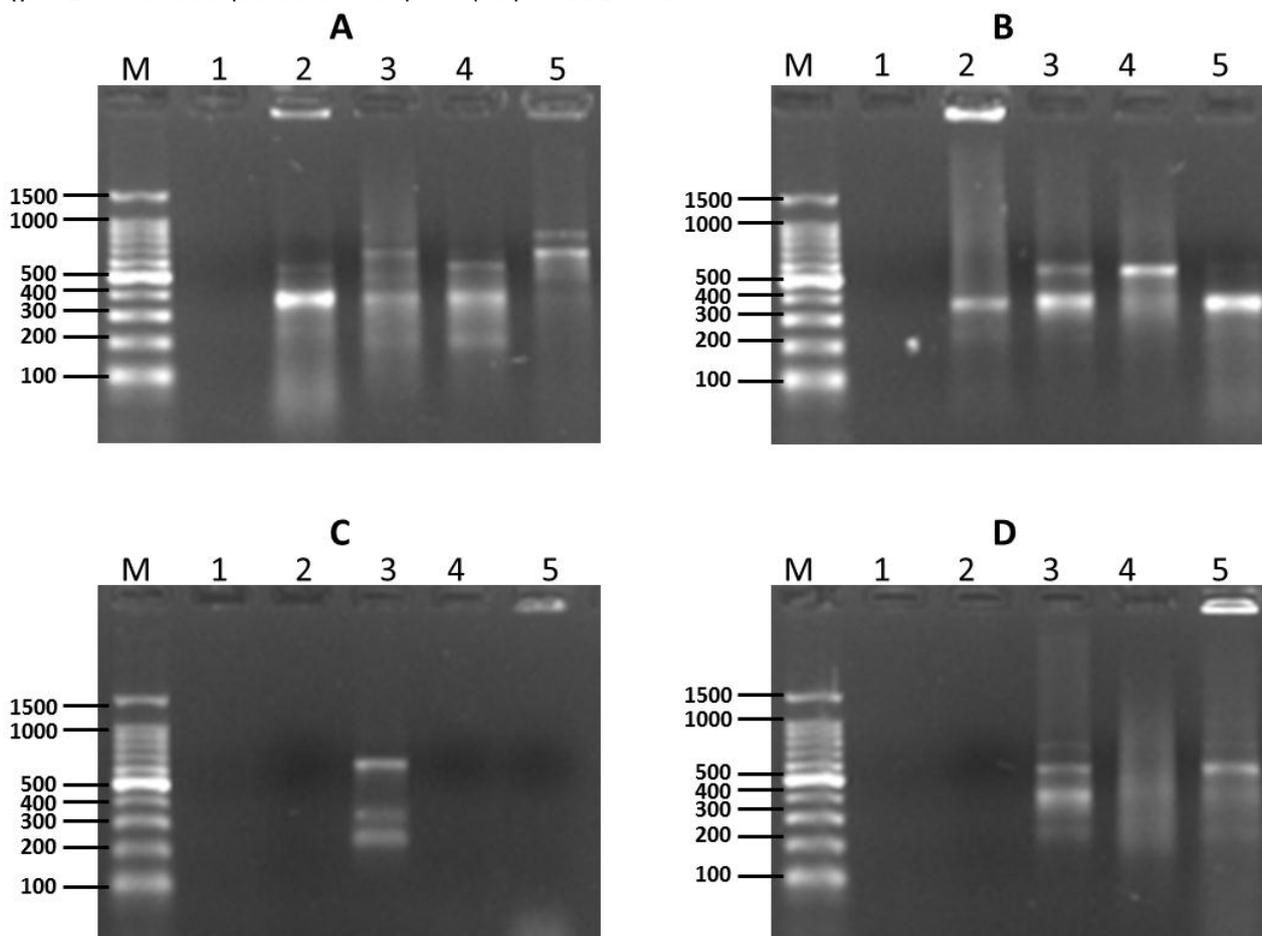
Com o objetivo de analisar a qualidade dos DNAs extraídos, estes foram utilizados em amplificação com a técnica de RAPD, dessa forma, as análises desenvolvidas foram as comparações do potencial de amplificação do DNA obtido a partir de cada técnica de extração frente as diferentes espécies bacterianas.

O RAPD com os DNAs de *E. coli* obtidos com os diferentes protocolos mostrou-se eficiente na amplificação, no entanto é possível notar uma amplificação mais intensa com o protocolo 1, que utiliza apenas SDS para lise celular, apesar de que a extração por SDS e proteinase K apresentou um número maior de bandas (Figura 1- painel A). Salienta-se ainda, a significativa variação do padrão de amplificação para mesma espécie, onde a única variável foi a forma de obtenção do DNA, o que corrobora com vários autores, quanto a interferência da qualidade do DNA na amplificação por PCR (SAMBROOK, RUSSEL, 2001).

Na amplificação em *Salmonella Typhimurium*, assim como, em *E. coli* todos os protocolos funcionaram adequadamente, apresentando amplicons. Entretanto, não é possível verificar maiores diferenças na amplificação a não ser pela intensidade maior com a extração pelo FTA (Classic Card), mas ainda, ressaltando a diferença no padrão de amplificação conforme o tipo de extração utilizado para obtenção do DNA (Figura1, painel B).

Nas bactérias Gram-negativas houve amplificação em todos os protocolos, mostrando que provavelmente devido à menor espessura da membrana celular existe uma maior facilidade em romper esta parede e liberar os ácidos nucléicos.

Figura 1 – Análise da qualidade da amplificação por RAPD-PCR.



Eletróforese em gel de agarose 1%, onde segue em cada canaleta: (M) – Marcador molecular Ladder 100 (Ludwig); (1) Controle negativo, sem a adição de DNA molde; resultados de amplificação com DNA extraído pelos métodos de (2) – Extração por SDS; (3) – Extração com SDS e proteinase K; (4) – Extração por choque-térmico; e 5 – Extração pelo método com o papel FTA. Seguem-se em cada painel as a mplificações com os DNAs extraídos de (A) *E. coli*; (B) *S. Typhimurium*; (C) *S. epidermidis*; (D) *S. aureus*.

Fonte: os autores.

Amplificação por PCR da bactéria Gram-positiva *S. epidermidis* teve ausência de amplificação quanto ao protocolo de extração com SDS, o que indica que o tratamento com SDS parece ser insuficiente para a extração principalmente na etapa de rompimento da parede celular desta bactéria. Da mesma forma, os protocolos, extração térmica e com o FTA – Classic Card, também não apresentaram amplificação, sendo que o DNA obtido com procedimento 2 foi único que apresentou amplicons (Figura 1, painel C).

A amplificação do DNA de *S. aureus*, ocorreu apenas nos protocolos 2 (uso de proteinase K) e 4 que foi a extração feita com o FTA Classic Card, enquanto para o procedimento 1 não houve amplificação e o procedimento 3 (choque térmico), ocorreu o aparecimento de um arraste (Figura 1, D). Segundo trabalhos realizados por Nogueira et al. (2004), uma possível explicação para a dificuldade de amplificação de bactérias Gram positivas é a presença de resíduos específicos em sua parede celular que podem interferir em alguma etapa da reação.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa que as Gram-negativas, dificultando a lise da parede celular. Segundo Holt et al, (1994), existe uma enzima específica para lise da parede celular de estafilococcus, a lysostaphin, que é utilizada juntamente com a proteinase k para obtenção de ácidos nucleicos com boa qualidade e quantidade. Como também sugerido por Welsh e McClelland (1990), que utilizam um protocolo específico para *Staphylococcus*, no qual foram utilizadas as enzimas lysostaphin e proteinase

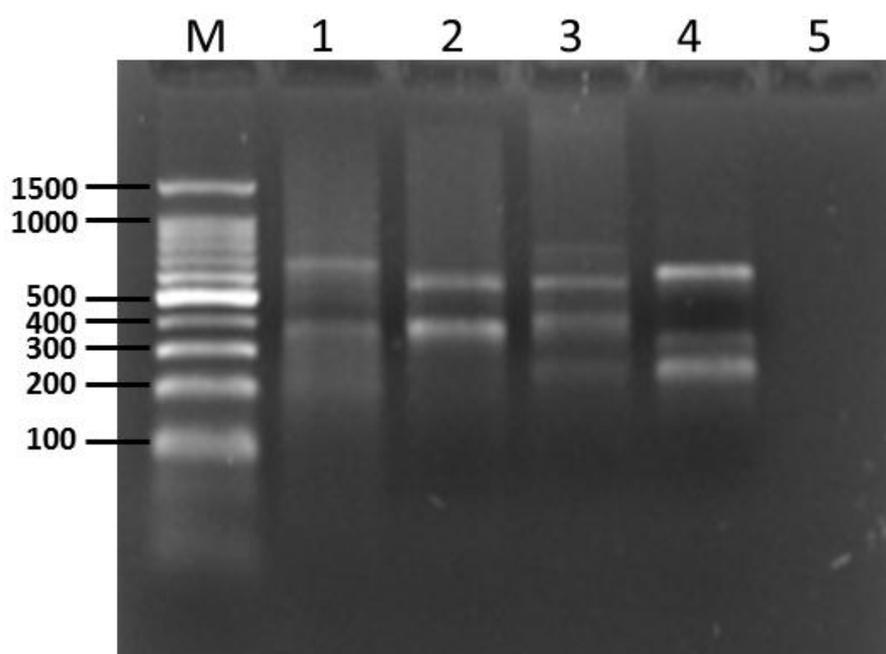
K, obtendo bons resultados, indicando que apesar da dificuldade dos protocolos simples de extração de DNA para as bactérias Gram-positivas, com essas modificações podem fornecer bons resultados com baixo custo.

O problema mais comum é a baixa amplificação devido à contaminantes orgânicos no extrato de DNA, entretanto, como com os DNA das bactérias Gram-negativas houve amplificação em todos os procedimentos de extração, estes foram eficientes quanto a qualidade do DNA. Excetua-se possíveis contaminações por solventes orgânicos como o fenol-clorofórmio nos protocolos com SDS, já que os protocolos por extração térmica e pelo FTA não utilizaram solventes orgânicos (NOGUEIRA et al, 2004). Nesse sentido, uma vantagem do FTA Classic Card, é que sua solução de extração fornecida com Kit não possui solventes orgânicos, impossibilitando este contaminante (TIERNEY, 2003).

Outra vantagem do método é que o papel impregnado com as células pode ser armazenado por um longo tempo, preservando os aspectos essenciais (TIERNEY, 2003). Entretanto, apesar de o fabricante do Kit indicar seu uso com sucesso para células Gram positivas isto não foi possível para ambos as bactérias, o que indica uma limitação do Kit.

Além do protocolo de extração de DNA contendo proteinase K (procedimento 2) ter apresentado melhores resultados em termos quantitativos, obtendo-se mais DNA; com esta metodologia de extração, obteve-se DNA para utilização como molde para amplificação com a melhor qualidade, sendo possível perceber amplicons em todas as espécies de bactérias analisadas. Isso foi posteriormente confirmado quando realizada a amplificação com o método de RAPD, utilizando como molde os DNAs das diferentes espécies (Figura 2). Assim, esta metodologia de extração apresentou superior qualidade das bandas amplificadas, com maior intensidade, definição e número de bandas, no entanto ressalta-se que a extração com a adição de proteinase K requer diversas etapas de extração, o que pode significar um risco adicional, com a contaminação com solventes orgânicos, além de um elevado tempo de extração.

Figura 12 – Análise da amplificação por PCR de DNA extraído com proteinase K.



Corrida em gel de agarose 1,% corado com brometo de etídio: onde aparecem nas canaletas: M – Marcador molecular Ladder 100 (Ludwig); 1 - *E.coli*; 2 - *S. Typhimurium*; 3 - *S. epidermidis* ; 4 - *S.aureus*;e 5 – Controle negativo – contendo todos os componentes da reação exceto o DNA.

Fonte: os autores.

4 CONCLUSÃO

A extração mais indicada para a PCR-RAPD é a utilização com a metodologia que apresenta proteinase K. Apesar da qualidade de DNA amplificado, comparando com a extração pelo FTA Classic Card, ele possui um maior tempo de extração, aumentando possíveis erros de manipulação. Foi possível obter amplificação por RAPD-PCR com ambas as bactérias Gram-negativas para todas as metodologias de extração de DNA, entretanto, para bactérias Gram-positivas foi totalmente funcional apenas com o protocolo contendo proteinase K. Nessas bactérias o FTA Classic Card não apresentou uniformidade em nossos resultados. Estas diferenças podem ser atribuídas às diferenças na estrutura da parede celular, o que poderia explicar a falha aqui verificada na amplificação do DNA da bactéria Gram positivas. De qualquer forma, estas inconsistências devem ser consideradas na adoção do protocolo escolhido para amplificação em RAPD-PCR, sugerindo que há a necessidade de novos estudos para a confirmação ou não do seu uso pleno em reações de amplificação, em especial para RAPD.

Comparison of different protocols for bacterial DNA extraction to use in RAPD-PCR

Abstract

Several methods already described for the extraction of bacterial genomic DNA, but they are usually time consuming and with many steps, increasing the likelihood of failures due to excessive handling. The commercial Classic Card FTA Kit (Whatman) provides less time and fewer steps for the DNA extraction, however, there are reports of difficulties in its use in some cases for PCR amplification. The objective of this work was to perform qualitative comparison of bacterial DNAs obtained by four different extraction techniques before their use in RAPD-PCR. The tests for the DNA extraction were carried out with Gram-positive and Gram-negative, emphasizing the potential interference on results of the quality of the DNA. The methods compared of DNA extraction were: using only SDS to cell lyses, the second with the addition of SDS and proteinase K, the third with thermal shock method and the last the Classic Card FTA. The techniques were tested at two Gram-negative bacteria, Escherichia coli and Salmonella Typhimurium and two Gram-positive, Staphylococcus aureus and S. epidermidis. It can be seen that the extraction of DNA from Gram-positive, possibly due to have the thicker cell wall, amplifications were only with the use of extraction protocols with the addition of proteinase K, while the method of the Classic Card FTA kit not present uniform results. So, the DNA extraction method, affect the final amplified product, which can interfere on the analysis and results interpretation.

Keywords: DNA extraction. RAPD-PCR. Genetics of microorganisms. FTA.

REFERÊNCIAS

GERHARDT, Philipp. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Massachusetts: American Society for Microbiology, 1994.

GLICK, Bernard R; PARSTERNAK, Jack J. **Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA**. Waterloo. ASM Press, 2003.

HIRATA, M .H., TAVARES, T., HIRATA, R. D. C. Da biologia molecular à medicina: métodos comumente utilizados em farmacogenética. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 39, n. 4, p. 522-34, 2006.

HOLT, John G. et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore, 1994.

JIN, J. D., et al. Molecular Typing Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) and Detection of Virulence Genes of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum Biovar Gallinarum. **The Japanese Society of Veterinary Science**. n. 68, p. 1321-1326, 2006.

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.

MULLIS, K., FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**. v. 155, p. 335-350, 1987.

NOGUEIRA, Carla Ariane Minatel et al. Desempenho de kits comerciais e protocolos laboratoriais para a extração de DNA genômico bacteriano. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 6, n. 2, 2004.

QUINTAES, et al. Optimization of Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction for Molecular Typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 37, p. 143-147, 2004.

ROSA, D. D. Método rápido de extração de DNA de bactérias. **Summa phytopathol**. v. 34, n. 3, 2008.

ROWLANDS, Ruth Estela G. et al. Resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. p.36-39, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2. Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.

SAMBROOK, J., RUSSEL. D. W. **Molecular cloning: a Laboratory manual**, 3. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.

SARTORETTO, L.M., FARIAS, P. C. M. Diversidade genética e técnicas biotecnológicas. Unoesc & Ciência – ACET, Joaçaba, v. 1, n. 2, p. 155-162, 2010.

SCHENBERG, Ana Clara G. Elementos de Engenharia Genética. In: BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia: Avanços na Agricultura e Agroindústria: Classificação de Bactérias Fitopatogênicas utilizando técnicas baseadas em DNA**. Caxias do Sul. 2002.

TIERNEY, Amy. DNA in Crime Solving. In: BORÉN, Aluizio, SANTOS, Fabrício Rodrigues, ALMEIDA, Márcia Rogéria. **Biotecnologia de A à Z**. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa, 2003.

WATMAN BIOSCIENCE. **Preparation of Sample DNA for Downstream Analysis**. Folheto explicativo. Estados Unidos/Canadá, 2008

WELSH, J., MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.