



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76

Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2024

OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE RNA EM *ENCYCLIA* HOOK (Orchidaceae)

Leilane V. Tavares¹; Cláudia A. Bastos²

1. Bolsista – Modalidade Bolsa/FAPESB, Graduando em Bacharelado de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: leilanevtares@gmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cabastos@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Expressão gênica, Regulação gênica, Técnica molecular.

INTRODUÇÃO

Encyclia é o maior gênero de Laeliinae depois de *Epidendrum*. Segundo Bastos *et al.* (2018) são conhecidas cerca de 150 espécies do gênero e no Brasil foram registradas 39 espécies. Apesar dos esforços em detectar os miRNAs em algumas espécies de Orchidaceae, pouco se sabe sobre como os miRNAs atuam na formação das flores das orquídeas e muitos subgrupos dessa família precisam ter seus miRNA identificados nessa perspectiva. Assim, o presente trabalho objetivou extrair os RNAs do tecido da inflorescência de algumas espécies do gênero *Encyclia* a fim de estabelecer um protocolo de extração de RNA, apontando as etapas onde pequenas modificações podem surtir melhor efeito na extração de RNA no grupo de interesse e visando posteriores estudos de expressão gênica a partir de um banco de RNA para o gênero.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

As amostras do material vegetal foram maceradas com auxílio de uma ponteira de 1mL em nitrogênio líquido e armazenadas em um tubo de 1,5mL no nitrogênio líquido até o momento de prosseguir com a extração. Na capela foi adicionado 0,5 mL de trizol nas amostras e levadas ao vórtex na velocidade máxima por 5 minutos até completar a homogeneização. Após a homogeneização os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os tubos levados ao vórtex por 5 min na velocidade máxima. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 min. Os tubos foram levados a centrifugação a 14.000 rpm e 4°C por 15 min. O sobrenadante (fase superior, cerca de 500 µL, foi transferido para outro tubo com o auxílio de uma pipeta. Foi adicionado 1 mL de isopropanol, os tubos foram agitados e incubados por 2-24 horas a -20°C. Os tubos foram retirados do freezer e centrifugados a 14000 rpm e 4°C por 15-30 min. Toda a parte líquida foi descartada invertendo os tubos sem perder o pellet. Foi adicionado 1mL de etanol 100% (-20°C) e centrifugado a 14000 rpm e 4°C por 15 min. O etanol 100% foi descartado do tubo e adicionado etanol 70%. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm e 4°C por 15 min. Toda a parte líquida deve ser descartada sem perder o pellet. O pellet deve secar ao ar até que nenhum líquido seja visível e fique transparente. 20 - 30 µL de água tipo I autoclavada deve ser adicionada e pipetada várias vezes até que o pellet se dissolva. Para a avaliação da integridade das amostras extraídas, o RNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), corado com 1 gota de brometo de

etídio, levado a cuba de eletroforese por 30 min e posteriormente visualizado sob luz ultravioleta e a imagem captada pelo fotodocumentador. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro Nanodrop com o objetivo de determinar a quantidade e a qualidade (integridade). Esse protocolo sofreu algumas adaptações na tentativa de reduzir os custos das extrações de RNA.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

A extração de RNA vegetal para o sequenciamento apresenta desafios metodológicos para manter a estabilidade das moléculas. O RNA está sujeito à degradação desde as etapas iniciais com a lise celular até a quantificação final (Houseley & Tollervey, 2009). Para evitar a degradação e a perda de informações transcriptômicas, os protocolos de extração de RNA sugerem procedimentos importantes durante a manipulação, como o uso de equipamentos exclusivos para RNA e de áreas isoladas e descontaminadas de RNase (Florell *et al.*, 2001). O protocolo base sofreu algumas adaptações na tentativa de reduzir os custos das extrações de RNA.

No primeiro teste as amostras coletadas foram armazenadas no biofreezer. As amostras foram maceradas com auxílio de um ponteira de 1000 µL e nitrogênio líquido, armazenadas em um tubo de 1,5 mL, adicionando 200 µL de NaOH. Seguindo a mesma metodologia do protocolo base. Durante os testes foi observado que os tubos de 1,5 mL que armazenam as amostras no biofreezer ressecavam, quebrando durante a maceração com o uso das ponteiros, sendo necessário substituí-las.

O segundo teste foi seguido pela mesma metodologia do protocolo base com pequenas adaptações. As amostras utilizadas estavam armazenadas no nitrogênio líquido e foram maceradas no cadinho e pistilos congelados no biofreezer com adição de 200 µL de NaOH. A maceração no cadinho gelado foi realizada com maior velocidade diminuindo o tempo de maceração comparado ao tempo de maceração nos tubos de 1,5 mL. As relações de pureza dos RNAs provenientes das extrações foram registradas nas Tabelas.

Tabela 1: Razões de absorbância e concentrações de RNA nas amostras de *Encyclia* (Orchidaceae) armazenadas no nitrogênio, com adição de 200µL de NaOH quantificados no Nanodrop.

Amostra	A260/A280	Concentração(ng/µL)
A1	2.03	605.2
A2	1.98	439.0
A3	1.40	275.2
A4	1.89	166.5.

Para o procedimento do terceiro e quarto teste a adaptação foi o uso das amostras armazenadas no nitrogênio líquido e biofreezer, respectivamente, com a adição da areia autoclavada. As amostras foram maceradas no cadinho e pistilo congelado. No teste 3 uma amostra se degradou (Tabela 2), indicando contaminação. As amostras foram extraídas e avaliadas no espectrofotômetro e no Nanodrop. A integridade do RNA foi avaliada por Eletroforese em gel de agarose (Figura 1). A quantificação e a relação 260/230 foram extremamente baixas, mostrando

a contaminação das amostras (Tabela 2). Além disso, no gel de agarose não foi possível a visualização de uma das bandas correspondente ao RNA que foi degradado (Figura 1-C).

Tabela 2: Razões de absorbância e concentrações de RNA nas amostras de *Encyclia* (Orchidaceae) armazenadas no Nitrogênio, com adição de areia autoclavada, quantificados no Nanodrop.

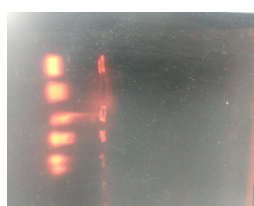
Amostra	A260/A280	Concentração(ng/μL)
A1	2.07	308.1
A2	1.39	598.6
A3	1.39	-38.1
A4	—	—
A5	1.96	493.4

Para considerar as amostras isentas de contaminação esses valores devem se situar entre 2,1 e 1,8, respectivamente. Quanto à quantidade, o ideal seria uma concentração de, no mínimo, 500 ng/μL (Asif *et al.*, 2006).

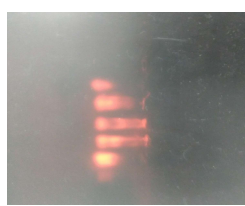
Tabela 3: Razões de absorbância e concentrações de RNA nas amostras de *Encyclia* (Orchidaceae) armazenadas no biofreezer, com adição de 200μL de NaOH, quantificados no Nanodrop.

Amostra	A260/A280	Concentração(ng/μL)
A1	1.99	270.6
A2	1.98	1437.2
A3	1.82	262.

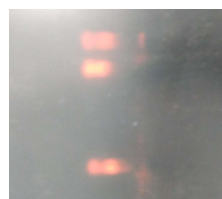
No quinto teste foram usadas 3 amostras armazenadas no biofreezer maceradas no cadinho gelado com a adição de 200 μL de NaOH. Ao comparar métodos que foram adaptados utilizados nos teste realizados, o quinto teste de extração de RNA apresentou melhor qualidade das amostras. Este teste obteve os melhores resultados de concentração, com relação às absorbância ideais, determinando pouca ou nenhuma contaminação com proteínas e polifenóis (Tabela 3).



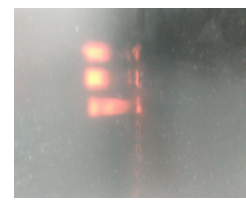
A



B



C



D

FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídeo, após 30 minutos de corrida à 100 volts (V). **A-** Amostra do Nitrogênio com adição de 200µL de NaOH com cadinho e pistilo congelado. **B-** Amostras do biofreezer com areia autoclavada com cadinho e pistilo congelado. **C-** Amostras do biofreezer com areia autoclavada, com cadinho e pistilo congelado. **D-** Amostra do biofreezer com adição de 200µL de NaOH, com cadinho e pistilo congelado.

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

A extração de RNA em plantas, especialmente em espécies ricas em compostos secundários como as orquídeas do gênero *Encyclia*, enfrenta desafios consideráveis devido à presença de polissacarídeos e polifenóis que comprometem a qualidade e a integridade das amostras. As adaptações metodológicas realizadas no protocolo base permitiram identificar técnicas que, embora reduzam alguns problemas, ainda enfrentam limitações quanto à pureza e à quantidade de RNA obtido. Portanto, o desenvolvimento contínuo e a otimização de protocolos específicos para diferentes espécies e tecidos vegetais são essenciais para garantir a obtenção de RNA de alta qualidade, facilitando estudos genéticos e moleculares que possam contribuir para o avanço no conhecimento sobre a regulação do desenvolvimento das orquídeas e outras plantas. A melhoria dessas técnicas também pode reduzir custos e minimizar o uso de reagentes insalubres, promovendo um ambiente de pesquisa mais seguro e eficiente.

REFERÊNCIAS

- ASIF, M.; TRIVEDI, P.; SOLOMOS, T.; TUCKER, M. 2006. Isolation of high-quality RNA from apple (*Malus domestica*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 54, n. 15, p. 5227-5229.
- BASTOS, C.A.; MENEGUZZO, T.E.C.; VAN DEN BERG, C. 2018. A taxonomic revision of the Brazilian species of *Encyclia* (Orchidaceae: Epidendroideae: Epidendreae). *Phytotaxa* 342 (1): 184.
- FLORELL, S. R.; COFFIN, C. M.; HOLDEN, J. A.; ZIMMERMANN, J. W.; GERWELS, J. W.; SUMMERS, B. K.; JONES, D. A.; LEACHMAN, S. A. 2001. Preservation of RNA for Functional Genomic Studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Modern Pathology*, v. 14, n. 2, p. 116–128. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/modpathol.3880267>>. Acesso em 06 ago. 2024.
- HOUSELEY, J.; TOLLERVEY, D. 2009. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell*, v. 136, n. 4, p. 763-776. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019>>. Acesso em 06 ago. 2024.