

Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma

DNA extraction from paraffin material protocol in order to analyse microsatellites in uterine leiomyoma

Ericson Martins Nascimento¹
Marilda Osti Spinelli¹
Consuelo Junqueira Rodrigues¹
Nilo Bozzini²

unitermos

Leiomioma uterino
Instabilidade de
microssatélites
Material parafinado

resumo

É apresentada a padronização de protocolo de extração de DNA de material parafinado para análise da instabilidade de microssatélites de genes relacionados ao leiomioma uterino, utilizando-se 30mg a 40mg de tecido retirado de blocos de parafina. Os blocos são desparafinizados por banhos de xilol a 65°C, reidratados com soluções de concentrações decrescentes de ETOH e água deionizada. A extração de DNA é obtida através das etapas de lise celular, com solução Promega, digestão de proteínas por proteinase K, precipitação com proteínas com solução Promega e precipitação do DNA com ETOH 70% gelado e ressuscitado com solução Promega. Este protocolo resulta em um DNA viável para uso na reação em cadeia da polimerase (PCR).

abstract

The standardization of the protocol of the DNA extraction from paraffin material in order to analyze the instability of microsatellites in genes related to the uterine leiomyoma, using 30 to 40mg of tissue removed from paraffin blocks is presented. Desparaffin through xilol baths to 65°C, rehydrated with solutions of decreasing concentrations of ETOH and deionisation water. The extraction of DNA was obtained through the stages of cellular lysis, with Promega solution, digestion of proteins by Proteinase K, precipitation proteins with Promega solution and precipitation of DNA with ETOH 70% colded and resuspended with Promega solution. This protocol results in a viable DNA to be use in the Polimerase Chain Reaction (PCR).

key words

Uterine leiomyoma
Instability of microsatellites
Paraffin material

O objetivo da presente comunicação é descrever um protocolo para extração de DNA genômico de tecido parafinado para análise em biologia molecular. O método consiste na desparafinização de 30mg a 40mg de tecido, seguida de reidratação e subsequente extração do DNA, obtida através das etapas de lise celular, digestão enzimática de proteínas e precipitação do DNA. O emprego deste protocolo resulta em DNA de boa qualidade para amplificação pelo PCR.

A literatura descreve vários protocolos de extração de DNA para tecido a fresco, sangue e células em cul-

tivo (1, 2). Tecidos embebidos em parafina também podem fornecer amostra de DNA, porém a sua extração necessita de um protocolo especial.

Com base nestes protocolos (1, 2), aplicamos os procedimentos para extração de DNA de fragmentos de leiomioma uterino, que haviam sido fixados em formalina não-tamponada e emblocados em parafina, com o objetivo de analisar marcadores de microssatélites. Por várias vezes obtivemos um DNA degradado e não-viável para amplificação pela reação em cadeia da polimerase (PCR). A presente comunicação

1. Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
2. Serviço de Ginecologia e Obstetria do Hospital das Clínicas de São Paulo.
Apoio financeiro: Fapesp 01/14052-5, CNPq, Capes.

tem por objetivo apresentar uma modificação do protocolo de extração de DNA, para tecido embebido em parafina, descrita por Wright e Manos (2).

O protocolo tem início com a obtenção das amostras a partir de blocos de parafina contendo fragmentos do tecido. Os blocos devem ser trimados para retirada do excesso de parafina e, depois, com auxílio de navalha histológica descartável, são obtidos 30mg a 40mg de material. Este material é transferido para um microtubo de 2.000µl e submetido, por duas vezes, a um banho de 1.000µl de xilol por 30 minutos a 65°C, centrifugado a 14.000rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Após a desparafinação deve-se retirar todo o xilol com um banho de 1.000µl de ETOH 100% e outro de 1.000µl de ETOH a 95%, ambos à temperatura ambiente, por 1 minuto. Após esta etapa, o material deve ser reidratado com dois banhos de 1.000µl de ETOH a 70% e dois banhos de água deionizada. Em cada uma destas etapas o material deverá ser centrifugado a 14.000rpm por 5 minutos, sendo desprezado o sobrenadante. Estas etapas de lavagem do material são importantes para a retirada de todo xilol, pois este inativa a proteinase K, utilizada na etapa seguinte para digestão das proteínas.

A partir do material hidratado inicia-se a digestão das proteínas e a extração propriamente dita do DNA. Para tal, devem-se adicionar 600µl de solução de lise celular (Wizard Genomic DNA Purifications Kit – Promega) e incubar a 65°C por 60 minutos. A digestão das proteínas é feita adicionando-se solução de proteinase K (10µg/µl), numa proporção de 3,5µl da solução para cada 1mg de material parafinado, incubando-se *overnight* a 50°C-60°C. Na próxima etapa devem-se adicionar 200µl de solução de precipitação de proteínas (Wizard Genomic DNA Purifications Kit – Promega), homogeneizar, incubar 15 minutos em gelo, centrifugar a 14.000rpm por 2 minutos e descartar o sobrenadante. Neste recipiente acrescentam-se 600µl de ETOH a 70% gelado, centrifuga-se a 14.000rpm por 2 minutos, despreza-se o sobrenadante e adicionam-se 30µl de solução de reidratação de DNA (Wizard Genomic DNA Purifications Kit – Promega), incubando-se por 1 hora a 65°C. Estas amostras devem ser armazenadas a 4°C.

Com a utilização deste protocolo é possível se obter um DNA genômico de boa qualidade e concentração, verificada por análise em espectrofotometria, com razão A260/A280 = 1,7 a 2. A análise do DNA genômico total em gel de agarose a 2% (Figura 1) e de fragmentos de DNA amplificados por PCR (Figura 2) demonstrou que o

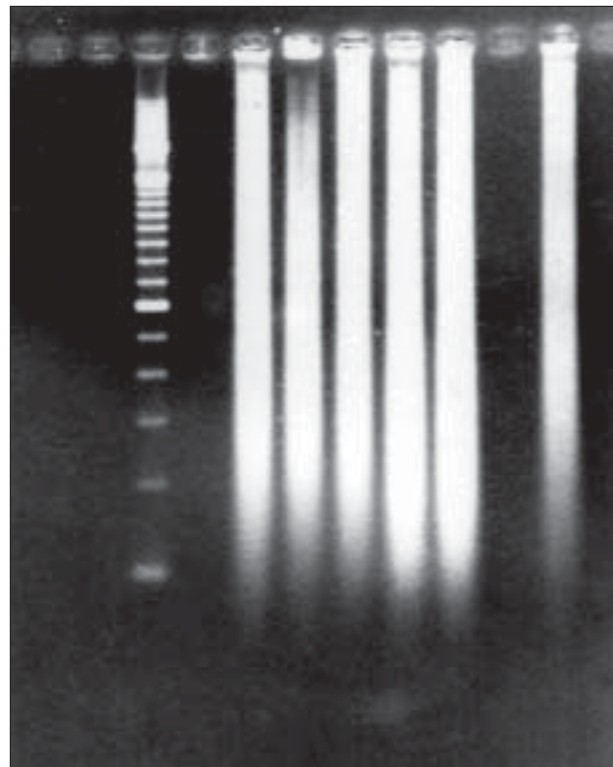


Figura 1 – Amostras de DNA total, extraídas de fragmentos de leiomiomas uterinos embebidos em parafina e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%

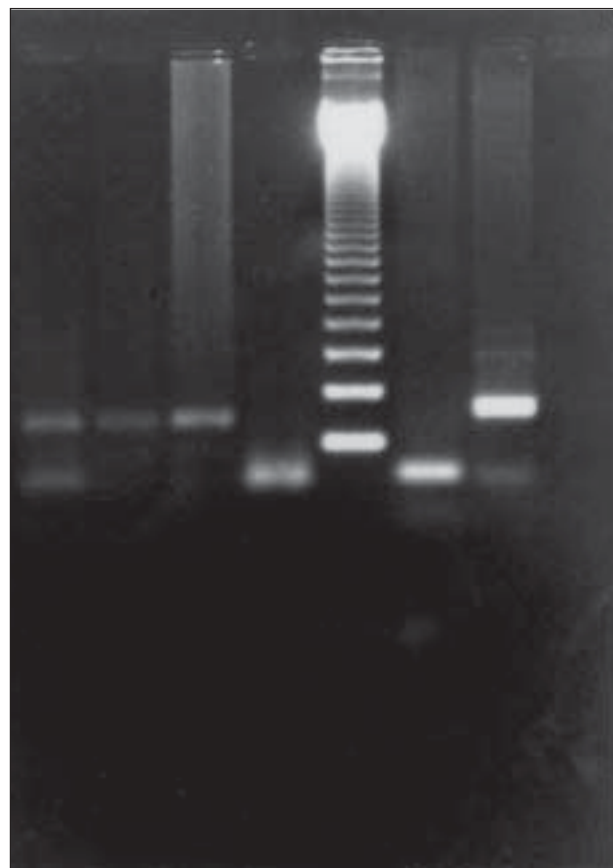


Figura 2 – Produto de PCR em gel de agarose. 1-3: Primer D7S666; 4 e 6: Primer D7S501; 5: Ladder 123bp; 7: Primer D7S471

DNA extraído apresenta excelente viabilidade e sucesso na amplificação.

Outros *kits* de extração de DNA podem ser utilizados a partir de material desparafinado, como os reagentes do GenomicPrep Cell and Tissue DNA Isolation Kit – Amershan

Pharmacia Biotech, lembrando que é necessário adicionar o volume adequado de proteinase K para digestão das proteínas. Técnicas *in house* e *kits* à base de magnetismo não demonstraram bons resultados para a extração de DNA de material parafinado.

Referências

1. Isola, J. *et al.* Analysis of change in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor sample. *Am. J. Pathol.*, 145(6): 1301-8, 1994.
2. Wright, D.K. & Manos, M.M. Sample Preparation from Paraffin – Embedded tissues. In: Innis, M.A. (ed.) *PCR Protocols: a guide to methods and application*. San Diego: Academic Press, 1990. p. 153-8.

Endereço para correspondência

Consuelo Junqueira Rodrigues
Avenida Dr. Arnaldo 455/1304
Cerqueira César
CEP 01246-903 – São Paulo-SP