

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA EXTRAÇÃO DE DNA EM NEMATÓIDES VERMIFORMES. Optimization and validation of methodology to DNA extraction in vermiform nematodes.

AMORIM, F.T.¹; SILVA, S.A.¹; MACHADO, A.C.Z.¹.

¹Laboratório de Nematologia, Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina, PR.

E-mail: felipeeamorim@hotmail.com

O primeiro passo para a realização de estudos em biologia molecular se dá na extração de ácidos nucleicos. O isolamento do DNA genômico pode ser utilizado para verificar presença e/ou ausência de genes, sequenciamentos e identificação de espécies com maior confiabilidade. Para a extração de DNA em nematoides, a maior dificuldade é o volume de DNA gerado, principalmente quando extraído de um único indivíduo, que implica em baixas concentrações e menor eficiência. O método via “proteínase K” ou WLB (*Wormlysis buffer*) tem por característica ser rápido, exigindo, basicamente, apenas tempo e temperatura ideais de incubação para a atividade enzimática, o que o torna prático dentro da rotina laboratorial. Assim, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar a técnica de extração via “proteínase K” buscando-se maior eficácia na extração de DNA em nematoides. O protocolo original de WLB não cita como necessário um tempo de incubação da amostra antes de submetê-la à temperatura de ativação enzimática. Nesse sentido, foram coletados 24 nematoides da espécie *Pratylenchus brachyurus* via Funil de Baermann, que foram submetidos à extração de DNA pelo método modificado de WLB, sendo 12 nematoides submetidos a um período de incubação (4°C/3h) antes da ciclagem já utilizada (60°C/1h; 95°C/15min) e 12 sem período de incubação. As amostras foram quantificadas e seguiu-se a reação de PCR da região D2/D3 rDNA. Os resultados obtidos mostraram eficiência de 83,3% nas amostras que sofreram processo de incubação contra 58,3% nas amostras não incubadas, diferença de 25% entre os métodos. O mesmo comportamento foi observado em outras espécies do tipo vermiforme. Assim, pode-se concluir que a incubação inicial das amostras aumentou a eficiência de extração de DNA e pode ser adotada para este tipo de método (WLB em nematoides vermiformes).

Palavras-chave: Proteínase K; *Wormlysis buffer*; Técnicas moleculares