

(11) Número de Publicação: **PT 116634 A**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 15/10** (2006.01) **C12Q 1/00** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2018.01)

(12) **PEDIDO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2020.08.07</b>	(73) Titular(es): <b>UNIVERSIDADE DO MINHO</b> <b>LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA</b>	<b>PT</b>
(30) Prioridade(s):		
(43) Data de publicação do pedido: <b>2022.02.07</b>	(72) Inventor(es): <b>ÁNGELA MARIA ARAÚJO DA COSTA</b> <b>ANDRÉIA DE OLIVEIRA DOS SANTOS GUIET</b> <b>JOANA LÚCIA DE LIMA CORREIA RODRIGUES</b> <b>EDUARDO JOSÉ GUDIÑA PÉREZ</b> <b>SARA ISABEL DA CRUZ SILVÉRIO</b>	<b>PT</b> <b>PT</b> <b>PT</b> <b>PT</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: /	(74) Mandatário: <b>MARCO ALEXANDRE GOMES DA SILVA PIRES DE SOUSA</b> <b>RUA QUINTA DO MONTE, 96 - 1º DTO. 4805-151 CALDAS</b> <b>DAS TAIPAS</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **MÉTODO E KIT DE EXTRAÇÃO DE ADN DE ELEVADA QUALIDADE, ADEQUADO PARA ESTUDOS METAGENÓMICOS, A PARTIR DE AMOSTRAS QUE CONTENHAM ELEVADOS NÍVEIS DE ÁCIDOS HÚMICOS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO DESCREVE UM MÉTODO INOVADOR PARA A EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN) METAGENÓMICO A PARTIR DE SOLOS, OU OUTRAS FONTES AMBIENTAIS, QUE APRESENTEM ELEVADOS NÍVEIS DE ÁCIDOS HÚMICOS. MAIS ESPECIFICAMENTE, TRATA-SE DE UM MÉTODO OTIMIZADO QUE ALIA A UTILIZAÇÃO DOS REAGENTES DE FORMA INOVADORA E VANTAJOSA, COM A COMBINAÇÃO ADEQUADA DOS MÉTODOS DE LISE PARA PERMITIR UMA RÁPIDA, EFICIENTE E ECONÓMICA EXTRAÇÃO DO ADN TOTAL COM A QUANTIDADE, PUREZA E ELEVADO PESO MOLECULAR NECESSÁRIOS PARA POSTERIORES ABORDAGENS METAGENÓMICAS. A OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO, DO TAMPÃO DE LISE CELULAR, E A ADIÇÃO DE AGENTES DE REMOÇÃO EFICAZES PARA ELIMINAR OS CONTAMINANTES POSSIBILITA A REDUÇÃO DA DURAÇÃO DO PROTOCOLO EM VÁRIAS HORAS SEM FRAGMENTAR EXCESSIVAMENTE O ADN METAGENÓMICO. UMA SEGUNDA REIVINDICAÇÃO DA PRESENTE DIVULGAÇÃO ESTÁ RELACIONADA COM A PREPARAÇÃO DE UM KIT COMERCIAL PARA A EXTRAÇÃO DE ADN.

## RESUMO

### **MÉTODO E KIT DE EXTRAÇÃO DE ADN DE ELEVADA QUALIDADE, ADEQUADO PARA ESTUDOS METAGENÓMICOS, A PARTIR DE AMOSTRAS QUE CONTENHAM ELEVADOS NÍVEIS DE ÁCIDOS HÚMICOS**

A presente invenção descreve um método inovador para a extração e purificação de ácido desoxirribonucleico (ADN) metagenómico a partir de solos, ou outras fontes ambientais, que apresentem elevados níveis de ácidos húmicos. Mais especificamente, trata-se de um método otimizado que alia a utilização dos reagentes de forma inovadora e vantajosa, com a combinação adequada dos métodos de lise para permitir uma rápida, eficiente e económica extração do ADN total com a quantidade, pureza e elevado peso molecular necessários para posteriores abordagens metagenómicas. A otimização do método, do tampão de lise celular, e a adição de agentes de remoção eficazes para eliminar os contaminantes possibilita a redução da duração do protocolo em várias horas sem fragmentar excessivamente o ADN metagenómico. Uma segunda reivindicação da presente divulgação está relacionada com a preparação de um kit comercial para a extração de ADN.

## DESCRIÇÃO

**MÉTODO E KIT DE EXTRAÇÃO DE ADN DE ELEVADA QUALIDADE, ADEQUADO PARA ESTUDOS METAGENÓMICOS, A PARTIR DE AMOSTRAS QUE CONTENHAM ELEVADOS NÍVEIS DE ÁCIDOS HÚMICOS**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se ao tópico geral de extração de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de amostras ambientais. Mais especificamente, é descrito um método otimizado para a extração de ADN a partir de amostras com elevado teor em ácidos húmicos, resultando no isolamento de ADN, com elevada pureza e peso molecular, adequado para a construção de bibliotecas metagenómicas ou outras abordagens meta-ómicas. Uma segunda reivindicação da presente divulgação está relacionada com a preparação de um kit comercial para a extração de ADN.

### **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A economia mundial está atualmente a promover abordagens mais sustentáveis. A biomassa lignocelulósica tem sido bastante usada como substituto de fontes energéticas fósseis, uma vez que, este tipo de biomassa é considerado um recurso bio-renovável de baixo custo devido à sua abundância e produção constante. Esta biomassa encontra-se geralmente em solos florestais ou pastagens, habitats de compostagem, resíduos agroflorestais, etc.

As enzimas são catalisadores biológicos de elevada eficiência e exercem um papel fundamental na biotecnologia moderna e sustentável, mais precisamente nos chamados processos de conversão "amigos do ambiente". A hidrólise enzimática é um passo crucial na bioconversão da lignocelulose. Recentemente, recorrendo a técnicas

metagenómicas, tem sido possível identificar novas enzimas com capacidade para degradar a lignocelulose.

As abordagens metagenómicas têm permitido aceder a uma enorme diversidade microbiológica, até então desconhecida. A metagenómica funcional é uma técnica avançada que tem permitido identificar novas enzimas e mecanismos bioquímicos com atividades biológicas promissoras. O passo crítico para a construção de uma biblioteca metagenómica é o isolamento de ADN metagenómico com elevado peso molecular.

Os solos ou outros materiais deste tipo (e.g. composto, rúmen animal em pó, bagaço, fezes e estrume, solo da rizosfera das plantas, solo marinho ou lamas industriais e municipais) são ambientes chave para a procura de novos biocatalisadores, uma vez que, representam meios extremamente complexos e com uma enorme variação nas propriedades químicas, ambientais e microbiológicas. No entanto, muitas destas propriedades têm um impacto bastante significativo na extração do ADN. Já desde os anos 80 que têm sido publicados vários métodos para a extração de ADN de elevado peso molecular com a pureza e o rendimento necessários para abordagens metagenómicas.

As substâncias húmicas (ácidos húmicos e flúvicos) estão naturalmente presentes em solos com alto teor de resíduos lignocelulósicos e também são geralmente usadas na agricultura como suplemento para os solos. Estes compostos são essencialmente produzidos através da biodegradação da matéria orgânica morta. Os ácidos húmicos são o principal componente das chamadas substâncias húmicas e podem estar presentes em solos, carvão, turfa, água marinha, lagos distróficos, etc. A designação de ácidos húmicos refere-se a uma mistura complexa de diferentes ácidos que contêm os grupos carboxilo e fenólico. Embora estes ácidos sejam

importantes e benéficos para os solos, a sua presença nas amostras a partir das quais se pretende isolar o ADN pode interferir significativamente na pureza do ADN e, conseqüentemente, afetar posteriores aplicações do mesmo.

A co-extração de substâncias húmicas, evidenciada pela coloração acastanhada dos extratos de ADN, inibe a atividade de algumas enzimas, o que limita as aplicações a jusante do ADN. Amostras com elevado teor de material lignocelulósico, como habitats de compostagem ou solos florestais, são suscetíveis de apresentar um elevado conteúdo de substâncias húmicas. Apesar dos esforços científicos efetuados nas últimas décadas para desenvolver metodologias específicas para melhorar a qualidade do ADN, a sua recuperação com elevada pureza e elevado peso molecular continua a ser um processo difícil.

Já foram testados métodos morosos como a utilização de sal (por exemplo CsCl), gradientes de densidade, etapas de precipitação extensas e repetitivas ou ainda procedimentos cromatográficos dispendiosos. No entanto, estas metodologias, ou não são tão rentáveis, ou requerem etapas adicionais para uma maior purificação do ADN, nomeadamente a remoção dos ácidos húmicos e a seleção dos tamanhos ideais, o que pode levar à fragmentação ou mesmo à perda das moléculas de ácido nucleico.

Atualmente, a tecnologia para extrair ADN a partir de amostras de solo altamente contaminado ainda continua a ser um fator limitante para estudos meta-ómicos. Os kits de extração de ADN comercialmente disponíveis têm limitações significativas na obtenção de quantidades elevadas de ADN com elevado peso molecular. Além disso, estes kits são caros e os que se revelaram mais adequados para a extração de ADN de elevado peso molecular foram descontinuados.

O rendimento do processo de extração de ADN é um aspeto bastante importante dado que a extração de ADN a partir do solo é frequentemente incompleta, isto porque algum ADN é inacessível, o que significa que não será contabilizado para posteriores análises. O nível de fragmentação é também um fator importante, uma vez que, pequenos fragmentos (com menos de 30 Kb) não são adequados para a análise de genomas ou metagenomas completos, ou ainda para o estudo e exploração de vias metabólicas completas ou virtualmente completas.

Até ao momento, foram desenvolvidos poucos métodos de extração para obter ADN de elevada pureza e elevado peso molecular. A invenção descrita no documento WO/2004/018673 refere-se a um dispositivo para o isolamento e/ou purificação de moléculas de ácido nucleico com grande diversidade no que diz respeito ao seu tamanho. Este procedimento é complexo, dispendioso e moroso, uma vez que, envolve a construção de um dispositivo com diferentes camadas matriciais.

O pedido PCT publicado com o número WO/2000/073508 descreve um método comum com bons resultados, mas exclui amostras contaminadas. Outros métodos permitem obter ADN de elevado peso molecular, contudo, o ADN extraído está altamente fragmentado, como se observa no documento CN101148676, o que implica a utilização de técnicas adicionais para obter o ADN com o tamanho desejado.

A presente invenção foi levada a cabo para tentar resolver os problemas anteriormente descritos através do desenvolvimento de um método rápido, eficiente e barato para a extração do ADN total. A aplicação deste método resultou na obtenção de ADN de elevada pureza, com grande rendimento e elevado peso molecular. Este procedimento poderá ter uma vantagem significativa em relação aos

métodos atuais e poderá ser amplamente utilizado devido à sua simplicidade e eficiência.

### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção fornece um novo método para extrair e purificar ADN metagenómico a partir de amostras de solo, ou outras fontes ambientais, com elevados níveis de ácidos húmicos. Este método alia a utilização dos reagentes de uma forma inovadora e vantajosa, juntamente com uma combinação adequada dos métodos de lise celular. O novo protocolo permite uma extração rápida, eficiente e barata do ADN total com a quantidade, pureza e elevado peso molecular necessários para as abordagens metagenómicas. Uma pessoa com conhecimento na arte reconhece que o resultado do método aqui descrito é significativamente superior aos resultados obtidos utilizando os métodos atualmente conhecidos. Mais precisamente, esta metodologia baseia-se na lise química/enzimática combinada com uma lise mecânica suave do material celular, juntamente com o uso de carvão ativado em pó (PAC) e  $\text{CaCl}_2$  para remover não só os ácidos húmicos, mas também vários outros contaminantes. A otimização tanto do método de lise como do tampão de lise celular e a adição de agentes de remoção eficazes para eliminar os contaminantes permite reduzir em várias horas a duração do protocolo, sem fragmentar excessivamente o ADN metagenómico.

### **BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS**

Figura 1 - Representação esquemática das três etapas do método aqui descrito: PAC - carvão ativado em pó; TE - tampão Tris-ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); SDS - dodecil sulfato de sódio; C:I - Clorofórmio:Isopropanol.

Figura 2 - Caracterização do peso molecular do ADN por eletroforese em gel de agarose, 0,5% (m/v), a 4°C durante 24 horas. M -  $\lambda$  DNA-Mono Cut Mix (NEB); 1, 2 - duas réplicas técnicas: amostras 1 e 2.

Figura 3 - Avaliação da eficiência do método de extração por PCR realizado às amostras de ADN isoladas, através da amplificação do gene 16S rRNA. M - NZYDNA Ladder III; 1 e 2 - Amostra 1 e 2, respetivamente, representando duas réplicas técnicas do ADN metagenómico; 3 - Controlo positivo usando a estirpe *E. coli* EPI300-T1R ADN; 4 - Controlo Negativo (sem amostra).

### **DESCRIÇÃO DETALHADA**

A presente invenção refere-se ao tópico geral da extração de ADN a partir de amostras ambientais que contêm microrganismos cujo ADN é de interesse, isto é, que codifica para enzimas que decompõem biomassa lignocelulósica ou que podem ser aplicadas em diversas indústrias tais como celulose, papel, alimentos, rações, entre outras.

Mais especificamente, a presente invenção refere-se a um método otimizado de extração e purificação de ADN metagenómico de solos, ou de outras fontes ambientais, com elevados níveis de ácidos húmicos.

O presente método baseia-se numa lise química/enzimática e mecânica suave do material celular, juntamente com o uso de carvão ativado em pó (PAC) e  $\text{CaCl}_2$  para remover não só os ácidos húmicos, mas também vários outros contaminantes.

O PAC apresenta uma capacidade de adsorção excepcional devido à sua grande superfície e volume de poros, resultando num agente descontaminante adequado para amostras de solo ou outros materiais ambientais



relacionados. A otimização tanto do método de lise celular como do tampão de lise celular, e a adição de agentes de remoção eficazes como o PAC e o  $\text{CaCl}_2$  para eliminar os contaminantes, permite reduzir várias horas a duração do protocolo, sem fragmentar excessivamente o ADN metagenómico.

O novo protocolo permite uma extração rápida, eficiente e económica do ADN total com a quantidade, pureza e peso molecular adequados para estudos metagenómicos. Uma pessoa com conhecimentos correntes na arte reconhece que o resultado do método aqui descrito é significativamente superior aos resultados obtidos utilizando as técnicas atualmente conhecidas.

Esta invenção pode ser levada a cabo de muitas formas. Deve entender-se que a presente atividade inventiva deve ser considerada uma exemplificação dos princípios da invenção e não se destina a limitar a invenção ao método específico aqui descrito. Os resultados obtidos serão apresentados de seguida e algumas reivindicações específicas da presente invenção serão descritas em pormenor.

Em linhas gerais, para efeitos da presente invenção, o processo de extração e purificação do ADN metagenómico envolve três etapas, que estão apresentadas na Figura 1:

1. A primeira etapa corresponde à lise celular, que combina técnicas mecânicas e químicas/enzimáticas, utilizando um tampão de lise otimizado;
2. A segunda etapa corresponde à recuperação do ADN, através da remoção, por centrifugação, dos ácidos húmicos e outros contaminantes presentes na amostra que são capazes de adsorver no PAC e/ou flocular com  $\text{CaCl}_2$ , e a posterior recuperação do ADN por precipitação.

3. A terceira e última etapa corresponde à purificação do ADN bruto. Esta última etapa não só concentra quantitativamente o ADN, como também ajuda a aumentar a sua pureza, uma vez que, potenciais contaminantes adicionais permanecem em solução enquanto o ADN é seletivamente precipitado.

Os detalhes do método serão descritos abaixo. As sucessivas etapas do método de extração foram executadas utilizando produtos químicos, descritos na tabela 1, normalmente disponíveis no laboratório, e sem equipamento ou técnicas especializadas.

A tabela 1 apresenta informação sobre os produtos químicos utilizados nesta invenção. É importante salientar que uma pessoa com conhecimentos na arte sabe que as proporções exatas dos reagentes enumerados na tabela 1 podem variar, dependendo, por exemplo, do tipo de amostra, da quantidade de amostra a ser tratada, do número de organismos e/ou da quantidade de ADN na amostra, do objetivo do ensaio experimental, etc. Além disso, em cada etapa, os reagentes podem ser substituídos por outros com funções semelhantes.

Tabela 1 - Informação sobre os produtos químicos utilizados nesta invenção.

	<b>Reagente</b>	<b>Intervalo</b>	<b>Função</b>
<b>Químico</b>	Tris-HCl	50 - 200 mM	Mantém o pH evitando a ação prejudicial das DNases
	NaEDTA	10 - 150 mM	Agente quelante
	NaCl	0.5 - 2 M	Regula a osmolaridade
	TE	1X	Tampão para ressuspender o

			ADN
	Fosfato de sódio	100 - 150 mM	Mantém a integridade do ADN
	CaCl <sub>2</sub>	100 - 150 mM	Floculação dos ácidos húmicos
	SDS	0.5 - 10%	Detergente aniónico que solubilize proteínas e lípidos
	PEG 30%	0.2 - 0.6 volumes	Purificação e precipitação do ADN
	3M Acetato de sódio	1 volume	Precipitação do ADN
	Clorofórmio:Isopropanol	1 volume	Permite a separação de proteínas dos lisados celulares brutos
	Isopropanol	0.6 - 1 volume	Precipitação de ADN
	Etanol 70%	1 ml	Lavagem do ADN
	PAC	4 - 40 mesh 0.5 - 4%	Remove os ácidos húmicos e outros contaminantes
<b>Enzimático</b>	Lisozima	1 - 10 mg/ml	Cliva peptidoglicanos
	Proteinase K	1 - 20 mg/ml	Digere proteínas associadas ao ADN
	RNase A	0.2 - 50 mg/ml	Atividade de RNase

As condições experimentais para a realização da etapa de ruptura celular devem ser selecionadas de acordo com a especificidade da amostra e/ou tipo de células. Tal como descrito anteriormente para outros métodos conhecidos de extração de ADN metagenómico a partir de amostras de solo, a amostra de compostagem aqui usada foi também inicialmente submetida a lise química/enzimática das células. Adicionalmente, no presente método foi introduzida uma lise mecânica suave, recorrendo a esferas de vidro, para libertar o ADN, aumentando assim a eficácia da extração.

A quantidade de amostra de solo, ou amostras ambientais semelhantes, que se pode usar em cada extração de ADN, pode variar entre 100 mg e mais de 100 g. Tipicamente, utilizam-se aproximadamente 500 mg em kits comerciais e 5-10 g nas metodologias tradicionais.

A amostra de composto usada na presente atividade inventiva foi submetida a lise celular através da combinação de métodos mecânicos, enzimáticos e químicos. No que diz respeito à ação da lise mecânica, podem ser utilizadas esferas de vidro com um diâmetro que pode variar entre 100 e 700  $\mu\text{m}$ . Neste caso, as esferas de vidro utilizadas apresentavam preferencialmente diâmetros entre 425-600  $\mu\text{m}$ . A seleção do tamanho de esferas corretos para cada tipo de microrganismo pode aumentar a eficácia da lise celular. Normalmente, os kits comerciais ou ensaios experimentais combinam uma gama de tamanhos de esferas para garantir que todos os microrganismos presentes na amostra sejam abrangidos. No entanto, a utilização de esferas pequenas vai levar à quebra excessiva do ADN, não sendo por isso, apropriadas para a extração de ADN metagenómico. É importante realçar que os exemplos de tipos de esferas incluem, mas não estão limitados às esferas de vidro, podem ser usadas também esferas de metal, cerâmica e/ou pedra.

A combinação da lise enzimática com a lise química, é a estratégia mais utilizada para a extração de ADN metagenómico, pois sendo relativamente suave, evita a fragmentação excessiva do ADN. Inicialmente, a amostra de composto usada nesta invenção foi misturada com um tampão de extração. A lise enzimática e química envolve a seleção de condições e reagentes apropriados. Tipicamente, envolve uma ou duas etapas de incubação da mistura. A primeira etapa de incubação ocorre a aproximadamente 37°C, com agitação (entre 100 - 250 rotações por minuto (rpm)), durante 15 - 90 minutos. Contudo, esta primeira etapa pode ser eliminada, sendo efetuada apenas a segunda incubação. Neste caso, as condições de incubação são preferencialmente de cerca de 60 - 180 minutos, a uma temperatura de 60 - 70°C.

O tampão de lise contém pelo menos um agente tampão, por exemplo o Tris-HCl com uma concentração que pode variar entre 50 e 200 mM; um sal adequado, que pode ser o NaCl com uma concentração entre 500 mM e 2 M; e um agente quelante, como por exemplo o EDTA ou ácido etilenoglicol tetraacético (EGTA) com uma concentração que pode variar entre 10 e 150 mM. Também pode ser adicionado ao tampão de lise um detergente, com uma concentração final de cerca de 0,5 - 10% (m/v), sendo o dodecil sulfato de sódio (SDS) o detergente mais frequentemente referido, mas outros como o lauril sulfato de sódio, brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB), etc., também podem ser usados. Para além disso, e fazendo parte de uma reivindicação da presente invenção, o fosfato de sódio pode ser ocasionalmente adicionado em algumas experiências, uma vez que permite manter a integridade do ADN.

Enzimas como a proteinase K e/ou a lisozima podem ser adicionadas ao tampão de lise para promover a lise

enzimática, mas não são uma condição necessária. Para além disso, para a purificação do ADN, também é adicionado ao tampão de lise um agente com capacidade de remoção de contaminantes, como as substâncias húmicas, sendo o CTAB (0,5 - 2% (m/v)) o composto mais habitual, uma vez que, ajuda não só a desnaturar as membranas celulares, mas também permite preservar a integridade do ADN de elevado peso molecular. Uma pessoa com conhecimento na arte sabe que outros agentes purificantes como polivinilpolipirrolidona (PVPP), PAC,  $\text{CaCl}_2$ , sulfato de alumínio,  $\beta$ -mercaptoetanol, isotiocianato de guanidina ou fenol (combinados ou isolados), também podem ser utilizados para este fim.

O tampão de lise é preparado no volume e concentração desejados, adicionando, se necessário, água destilada. O pH do tampão de lise é ajustado a 8,0 para manter a integridade do ADN. Uma pessoa especialista na arte sabe que as quantidades exatas destes, ou de outros componentes que podem ser utilizadas na preparação do tampão de lise, podem variar, dependendo do tipo de amostra, da quantidade da amostra a ser tratada, da quantidade de ADN presente na amostra, etc.

A amostra de composto deve então ser submetida a um processo de homogeneização cuja duração pode variar entre 2 a 10 minutos. Na presente invenção, a amostra foi sujeita a um curto tempo de rutura, cerca de 5 minutos, e relativamente suave, utilizando para tal um vortex comum, em vez de um moinho de bolas. Estas condições operacionais permitiram a lise celular e a recuperação de quantidades consideráveis de ADN sem que ocorresse uma fragmentação excessiva.

Na maioria dos protocolos de extração de ADN, após a rutura das paredes celulares, o lisado obtido é centrifugado para

eliminar os sólidos (partículas indesejadas do solo e detritos celulares, contaminantes como cloro, odores, pigmentos, iões, metais pesados e ácidos húmicos). A centrifugação (entre 3000 - 15000 g), durante 5 a 20 minutos, pode ocorrer a 4°C ou à temperatura ambiente (cerca de 20 - 25 °C), dependendo do tipo de amostra ambiental.

Após a centrifugação, o sobrenadante que contém o ADN é transferido para um recipiente limpo para se proceder à extração e separação do ADN dos contaminantes adicionais. Para esse fim, diferentes misturas, tais como clorofórmio-álcool isoamílico, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, fenol:clorofórmio, clorofórmio:isopropanol, entre outras, são normalmente utilizadas para eliminar proteínas e detritos celulares que possam ainda permanecer em solução. A mistura é novamente centrifugada (entre 6000 - 12000 g), de 5 a 30 minutos, e a fase superior que contém o ADN é transferida para um tubo limpo sendo o ADN posteriormente precipitado. Para a precipitação do ADN podem ser usados vários reagentes de precipitação, tais como: polietilenoglicol (PEG), PEG/acetato de sódio, Etanol/NaCl, isopropanol, PEG/NaCl, LiCl, acetato de sódio, entre outros. O ADN pode ser deixado a precipitar à temperatura ambiente (entre 20 - 25°C) de 5 minutos a 2 horas, a 4°C de 20 minutos a 2 horas ou -20°C de 20 minutos a 2 horas. Neste último caso, os tubos são primeiro descongelados em banho de gelo e só depois o ADN é recuperado através de centrifugação (entre 6000 - 12000 g), a 4°C, durante 5 a 30 minutos. O *pellet* que contém o ADN genómico é ressuspenso em 500 µl de tampão TE (1X - 10 mM Tris, 1 mM Na EDTA, pH 8,0).

Na presente invenção, o sobrenadante que contém o ADN bruto foi transferido para um tubo limpo, sendo posteriormente

adicionado 1 volume de clorofórmio:isopropanol (24:1 v/v), e a mistura foi suavemente homogeneizada à mão. De seguida a mistura foi centrifugada a 10000 g, 4°C, durante 10 minutos. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para um tubo limpo e o ADN foi precipitado com 0,4 volumes de PEG 30%(m/v) e 1 volume de acetato de sódio 3M durante 20 minutos a -20°C. O ADN foi recuperado por centrifugação a 10000 g, 4°C, durante 10 minutos, e foi posteriormente ressuspenso em tampão 1X TE.

A última etapa da invenção compreende a purificação do ADN bruto. Vários passos podem ser necessários para eliminar os contaminantes restantes nesta etapa final da purificação do ADN. Pode ser utilizada uma segunda purificação com clorofórmio:isopropanol, clorofórmio:álcool isoamílico, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, fenol:clorofórmio, entre outros. Contudo, a maioria das técnicas anteriormente descritas relatam o uso de metodologias caras e complexas, como colunas de filtração, electroforese de gel de campo pulsado, gradientes de densidade de CsCl, precipitações extensivas e repetitivas, etc.

A presente invenção remove a maioria dos contaminantes durante a etapa de lise, reduzindo não só o tempo gasto na extração do ADN, mas também, a necessidade de uma posterior manipulação do ADN que pode levar à sua fragmentação ou perda.

O método da presente invenção pode ser utilizado para extrair ADN de uma vasta gama de amostras contendo um teor relativamente elevado de ácidos húmicos (por exemplo húmus, solo arenoso, solo salino, solo de compostagem, etc.). No entanto, não é um pré-requisito necessário que as amostras tenham ou sejam suscetíveis de conter substâncias húmicas.

A amostra utilizada nesta invenção corresponde a uma amostra de solo de compostagem recolhida durante a fase



termófila. No processo de compostagem, os microrganismos transformam a matéria orgânica e geram dióxido de carbono, calor, água e húmus. Em condições ótimas, a compostagem ocorre através de três fases: a fase inicial, fase mesófila ou de temperatura moderada, que dura poucos dias; a fase termófila ou de alta temperatura, que pode demorar poucos dias ou estender-se até vários meses; e finalmente uma fase de arrefecimento e maturação. Durante a fase termófila, as altas temperaturas aceleram a decomposição de gorduras, proteínas e hidratos de carbono complexos como a celulose e a hemicelulose, as principais moléculas estruturais das plantas.

Em linhas gerais, as amostras de solo, ou outros materiais deste tipo, podem ser recolhidas, analisadas imediatamente utilizando as técnicas conhecidas e adequadas para cada tipo de amostra ambiental, ou armazenadas no frio, num frigorífico a 4°C ou no congelador a -20°C, em recipientes apropriados. As amostras podem opcionalmente também ser secas ou dessecadas, utilizando equipamento apropriado. As amostras podem ser guardadas durante dias, semanas, meses ou anos, dependendo do tipo de opção de armazenamento. Em cada caso, deve ser recolhida uma quantidade suficiente de amostra para realizar a experiência, o que significa que o mínimo é 0,5 g.

Na presente invenção, foi recolhido aproximadamente 1 kg de amostra de composto que foi mantido durante várias semanas (cerca de 20 semanas) a aproximadamente 4°C.

As propriedades físico-químicas do composto são apresentadas na tabela 2 e foram avaliadas seguindo as metodologias comuns descritas no estado da arte. A análise elementar foi obtida por combustão automática. O teor de humidade da amostra foi determinado gravimetricamente utilizando uma estufa a 90°C. Para determinar o pH da

amostra de composto preparou-se uma mistura de água/composto (4:1 m/m) e o valor de pH foi obtido utilizando um medidor de pH comum com um eletrodo de vidro calibrado. Para quantificar os ácidos húmicos presentes na amostra de composto, foi utilizado o método de extração por precipitação ácida, um procedimento usual para uma pessoa com experiência na arte. A concentração de ácidos húmicos foi determinada através da medição da absorvância a 340 nm utilizando uma curva de calibração previamente preparada (0-1000 ng.µl<sup>-1</sup>) com ácidos húmicos comerciais.

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas da amostra de composto utilizada no método de extração de ADN.

Temperatura (°C)	Humidade (%)	pH	Carbo no total (%)	Hidrogénio total (%)	Enxofre total (%)	Azoto total (%)	Ácidos húmicos (mg.g <sup>-1</sup> composto)
62.7	57	6.96	13.23	4.22	0.41	1.15	10.6 ± 0.13

As características mais relevantes da atividade inventiva aqui divulgada serão, de seguida, detalhadas com vista a uma compreensão mais clara. A invenção não se limita à aplicação ilustrada na Figura 1, pelo contrário, esta invenção é capaz de ser executada de várias outras formas e a partir de um conjunto de outras amostras ambientais contaminadas.

Outra reivindicação da presente divulgação diz respeito ao desenvolvimento de um kit de extração de ADN. Este kit permitirá reduzir o tempo do processo de extração do ADN, uma vez que, as soluções para cada etapa estarão prontas para serem utilizadas. Para garantir a estabilidade dos reagentes por um longo período de tempo e assegurar a

extração eficiente de ADN, será necessário preparar e armazenar em separado seis soluções diferentes.

Os exemplos seguintes descrevem a presente invenção de forma mais pormenorizada. No entanto, deve realçar-se que a invenção não está limitada à seguinte descrição.

#### **Exemplo 1: Primeiro passo - lise celular**

Na presente invenção, a amostra de composto foi submetida a lise celular por via enzimática, química e mecânica. A lise enzimática e química dos microrganismos presentes nas amostras de solo envolve a seleção prévia dos reagentes e das condições adequadas de lise. Para este fim, misturou-se aproximadamente 1 g de composto com 5 ml de tampão de lise, ajustando-se o pH final para 8,0. Mais especificamente, na presente invenção, o tampão de lise incluiu 100 mM Tris-HCl, 100 mM Na EDTA, 1,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1 mg/ml de Proteinase K, 1 mg/ml de lisozima, 0,2 mg/ml de RNase A, 1% (m/v) de carvão ativado (4 - 8 mesh), sendo o volume posteriormente ajustado para 5 ml com água destilada. Foi ainda adicionado ao tampão aproximadamente 1 g de esferas de vidro (425 - 600 µm) e a mistura foi sujeita a agitação mecânica. A homogeneização foi realizada num vortex de bancada comum, à velocidade máxima, durante cerca de 5 minutos. Estas condições permitiram uma lise celular eficiente e o isolamento do ADN metagenómico sem apresentar uma excessiva fragmentação. Contudo, deve referir-se que o período de tempo e a velocidade de agitação podem ser ajustados de forma a garantir uma rutura eficiente das células e membranas dos microrganismos presentes na amostra, facilitando assim a subsequente libertação do ADN para o tampão de lise.

O lisado obtido foi posteriormente incubado a uma temperatura controlada de 37°C, com agitação a 150 rpm, durante aproximadamente 30 minutos. Após esta primeira etapa de incubação, adicionou-se 1 ml de SDS 20% (m/v) e a mistura foi novamente incubada por mais 30 minutos num banho de água quente sensivelmente a 65°C. No entanto, convém salientar que outras estratégias possíveis de incubação podem também ser utilizadas.

#### **Exemplo 2: Segunda etapa - Recuperação do ADN**

Como resultado da presente invenção, a segunda etapa descrita na figura 1 corresponde à recuperação do ADN. Para tal, o lisado foi centrifugado a 3200 g, 4°C, durante 10 minutos. Aproximadamente 15 ml do sobrenadante foram recolhidos e transferidos para um tubo limpo. Depois disso, foi adicionado 1 volume de clorofórmio:isopropanol (24:1 v/v) e a mistura foi suavemente homogeneizada à mão. A mistura foi centrifugada a 10000 g, 4°C, durante 5 minutos. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para um tubo limpo e o ADN precipitado. Uma reivindicação da presente invenção refere-se também aos solventes selecionados para a precipitação, que foram neste caso o acetato de sódio e o PEG. Mais precisamente, o ADN foi precipitado utilizando aproximadamente 1 volume de acetato de sódio 3M (pH 5,2) e 0,4 volumes de 30% (m/v) PEG (peso molecular 8000). A mistura foi invertida suavemente à mão e os tubos foram colocados a precipitar durante cerca de 20 minutos numa arca congeladora tradicional a -20°C. Os tubos foram depois, lentamente, descongelados em gelo e o ADN precipitado a 12000 g, 4°C, durante 10 minutos. O ADN bruto foi finalmente ressuscitado em 500 µl de tampão Tris-EDTA (TE) (1X - 10 mM Tris, 1 mM Na EDTA, pH 8,0). Uma pessoa com conhecimentos na arte reconhece a importância de ressuscitar o ADN num tampão com pouco sal (como o TE ou

outros como o Tris-HCl), de forma a assegurar a sua preservação e evitar a desnaturação ou degradação do ADN por ação de DNases.

### **Exemplo 3: Terceira etapa - Purificação do ADN**

A última etapa da atividade inventiva corresponde à purificação do ADN bruto. Para isso, foi adicionado 1 volume de clorofórmio:isopropanol (24:1 v/v) ao ADN ressuspenso em TE, a mistura foi depois homogeneizada suavemente invertendo o tubo à mão e posteriormente centrifugada a 12000 g, 4°C, durante 5 minutos. A fase aquosa (fase superior) foi transferida para um tubo limpo e foi adicionado 1 volume de isopropanol frio. O tubo foi invertido suavemente à mão de forma a homogeneizar a mistura e o ADN foi deixado a precipitar durante 5 minutos no gelo. O ADN precipitado foi recuperado por centrifugação a 12000 g, 4°C, durante 10 minutos. O *pellet* obtido foi lavado com 1 ml de etanol a 70% (v/v) e ficou depois a secar ao ar, entre 5 a 15 minutos, à temperatura ambiente. O ADN metagenómico foi dissolvido em 100 µl de tampão TE e foi armazenado a 4°C. Esta invenção descreve um método que demora cerca de 4 horas e pode ser realizado recorrendo a equipamento e reagentes de biologia molecular comuns e disponíveis no laboratório. A presente invenção permite obter ADN, com elevada pureza e elevado peso molecular, apropriado para a construção de bibliotecas metagenómicas ou outras abordagens meta-ómicas.

### **Exemplo 4 - Caracterização do ADN isolado a partir de amostras de composto com elevado teor em ácidos húmicos.**

O ADN isolado de acordo com o método acima descrito foi analisado e comparado com o ADN obtido utilizando outras técnicas convencionais.

O ADN foi quantificado utilizando o Nanodrop One e a sua pureza avaliada pela razão entre as leituras de absorvância a 260 e 280 nm ( $A_{260/280}$ ). Para quantificar o ADN foi estimado o valor médio  $\pm$  desvio padrão ( $\mu\text{g}$  ADN/g composto). Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3. Foram obtidos valores superiores a 10  $\mu\text{g}$  de ADN/g de composto e, quando comparados com os valores obtidos noutros trabalhos já publicados, pode verificar-se que estes são resultados muito bons. A razão espectrofotométrica 260/280 é conhecida por ser uma medida relativa de pureza de ADN, onde valores entre 1,8 e 2 são considerados indicadores de amostras altamente puras. Isto significa que a pureza obtida com este método ( $1,8 \pm 0,02$ ) foi muito boa.

Tabela 3 - Rendimento e pureza do ADN metagenómico isolado a partir da amostra de composto.

<b>ADN total isolado (<math>\mu\text{g.g}^{-1}</math> de composto)</b>	<b><math>A_{260/280}</math></b>	<b>Teor total de ácidos húmicos (<math>\mu\text{g.g}^{-1}</math> de composto)</b>	<b>% de remoção de ácidos húmicos</b>
10.5 $\pm$ 0.22	1.8 $\pm$ 0.02	3.01 $\pm$ 0.01	99.97 $\pm$ 0.02

A qualidade do ADN extraído (figura 2) foi avaliada por electroforese em gel de agarose 0,5% (m/v), em 1 X tampão EDTA Tris-acetato (TAE), a 25 V, 4°C, durante 24 horas. Como marcador molecular foi usado o  $\lambda$  ADN-Mono Cut Mix (1,503 a 48,502 bp) (NEB). Os resultados revelam bandas robustas e compactas e o tamanho dos fragmentos de ADN foi superior a 48 Kb. Foi apenas notada uma ligeira fragmentação do ADN, o que significa que o método inventivo não provocou a quebra excessiva do ADN.

O ADN isolado pode ser utilizado para vários fins, tais como a sequenciação, a amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR); a sequenciação por *shot gun*; várias análises de sequenciação de alto rendimento em plataformas de sequenciação de nova geração, tais como as plataformas Illumina HiSeq e MiSeq; na construção de bibliotecas metagenómicas, etc.

#### **Exemplo 5 - Amplificação do ADN**

A amplificação do ADN extraído foi efetuada por PCR, a título de exemplo, de forma a avaliar a pureza da amostra, uma vez que, as enzimas de PCR são extremamente sensíveis, ficando inibidas na presença de contaminantes.

Para amplificar o gene procariota 16S rRNA, foi utilizado o par de *primers* universais 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') e 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'). Os produtos amplificados foram separados por electroforese num gel de agarose a 0,8% (m/v), usando 80V, durante 45 minutos. O NZYDNA *Ladder III* (Nzytech, tamanho de gama 200 - 10000 bp) foi utilizado como marcador molecular. Na figura 3 é possível observar a amplificação do gene 16S rRNA, um fragmento com 1500 bp.

#### **Exemplo 6 - Construção de uma biblioteca metagenómica**

As abordagens meta-ómicas proporcionam aos cientistas a oportunidade de aceder a informação sobre o ecossistema do solo, contudo, atualmente a tecnologia usada na extração de ADN representa um fator limitante neste tipo de análise. A presente invenção resulta numa metodologia que permite obter ADN com elevada pureza e elevado peso molecular, bem como, elevados rendimentos, e, por conseguinte, tem vantagens substanciais quando comparado com outros métodos de extração de ADN existentes.

Para avaliar se o ADN extraído seria adequado para futuras aplicações em abordagens metagenómicas, foi construída uma

biblioteca metagenómica utilizando o kit *CopyControl™ fosmid library* (Epicentre Biotechnology). A biblioteca metagenómica foi construída com sucesso obtendo-se aproximadamente  $6,5 \times 10^{-3}$  unidades formadoras de colónias ( $\text{ufcml}^{-1}$ ). Os resultados evidenciaram que o ADN extraído tem as condições necessárias de pureza e tamanho para realizar análises metagenómicas.

A presente invenção permitiu diminuir consideravelmente o tempo de extração, através da eliminação de etapas adicionais de purificação, o que resultou também em maiores rendimentos e ADN com elevada pureza e peso molecular. Esta metodologia descreve e ilustra certas reivindicações preferenciais, mas uma pessoa com conhecimento na arte pode fazer várias alterações ou modificações ao método sem, contudo, afastar-se do espírito do conceito inventivo.



## REIVINDICAÇÕES

1. Método de extração e purificação de ácido desoxirribonucleico (ADN) metagenômico caracterizado por compreender:

i. uma lise celular de amostras de solo com microrganismos que codificam para enzimas que decompõem a biomassa lignocelulósica, combinando técnicas de lise mecânica, química e enzimática, e utilizando um tampão de lise otimizado;

ii. um método de extração de ADN utilizando carvão ativado em pó e/ou floculação com  $\text{CaCl}_2$  para remoção de contaminantes, tais como ácidos húmicos, com posterior recuperação de ADN por precipitação; e

iii. purificação do ADN bruto.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra é selecionada a partir do grupo: húmus, solo arenoso, solo salino, solo de composto.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a quantidade de amostra variar de 100 mg até 100 g.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os compostos utilizados na lise química são selecionados a partir do grupo: 50 - 200mM de Tris-HCl, 100 - 150mM de sal dissódico de ácido etilenodiamino tetra-acético (NaEDTA) ou ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA), 0,5 - 2M de NaCl, 100 - 150mM de Fosfato de Sódio, 100 - 150mm de  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 - 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) ou lauril sulfato de sódio ou brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), e 0,5 - 4% de carvão ativado em pó (PAC).

5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que os compostos utilizados na lise enzimática são selecionados a partir do grupo: 1 - 10 mg/ml de lisozima, 1 - 20 mg/ml de proteinase K e 0,2 - 50 mg/ml de RNase A.

6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a lise mecânica compreende o uso de esferas, em que as esferas são selecionadas de esferas de: vidro, metal, cerâmica e/ou pedra.

7. Método de acordo com a reivindicação 6, em que a quantidade de esferas de vidro é de um 1g com um diâmetro que varia de 100 a 700  $\mu\text{m}$ , de preferência entre 425 - 600  $\mu\text{m}$ .

8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as lises enzimática e química incluem uma primeira fase de incubação a uma temperatura aproximada de 37°C com agitação entre 100 - 250 rotações por minuto (rpm) durante 15 - 90 minutos.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que as lises enzimática e química incluem uma segunda etapa de incubação durante um período de cerca de 60 - 180 minutos a uma temperatura de 60 - 70°C.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o agente de remoção de contaminantes é selecionado do grupo: CTAB, PVPP, sulfato de alumínio,  $\beta$ -mercaptoetanol, isotiocianato de guanidina, fenol, PAC ou  $\text{CaCl}_2$ , ou suas misturas.

11. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o pH do tampão de lise é 8,0.

12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra de composto é submetida a uma lise mecânica suave durante 2 a 10 minutos, utilizando um vortex comum.

13. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o lisado obtido é centrifugado entre 3000 - 15000 g, durante 5 a 20 minutos, a 4°C ou à temperatura ambiente entre 20 e 25°C.

14. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a extração do ADN utiliza diferentes misturas tais como clorofórmio:isopropanol, clorofórmio:álcool isoamílico, fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, fenol:clorofórmio, entre outros.

15. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o ADN bruto é precipitado utilizando reagentes precipitantes selecionados do grupo: polietilenoglicol (PEG), PEG/acetato de sódio, Etanol/NaCl, Isopropanol, PEG/NaCl, LiCl, Acetato de sódio entre outros, e de seguida, é recuperado por centrifugação entre 6000 - 12000 g durante 5 a 30 minutos.

16. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a fase aquosa é precipitada com acetato de sódio e PEG e mantida num congelador tradicional a -20°C durante 20 minutos.

17. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra é descongelada em gelo por centrifugação entre 6000 - 12000 g, durante 5 - 30 minutos para obter o ADN precipitado, e posteriormente o ADN precipitado é ressuspenso em 500 µl de tampão Tris-EDTA (TE), preparado a partir de 10 mM Tris e 1 mM Na EDTA, com um pH de 8,0.

18. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o ADN bruto é misturado com 1 volume de clorofórmio:isopropanol

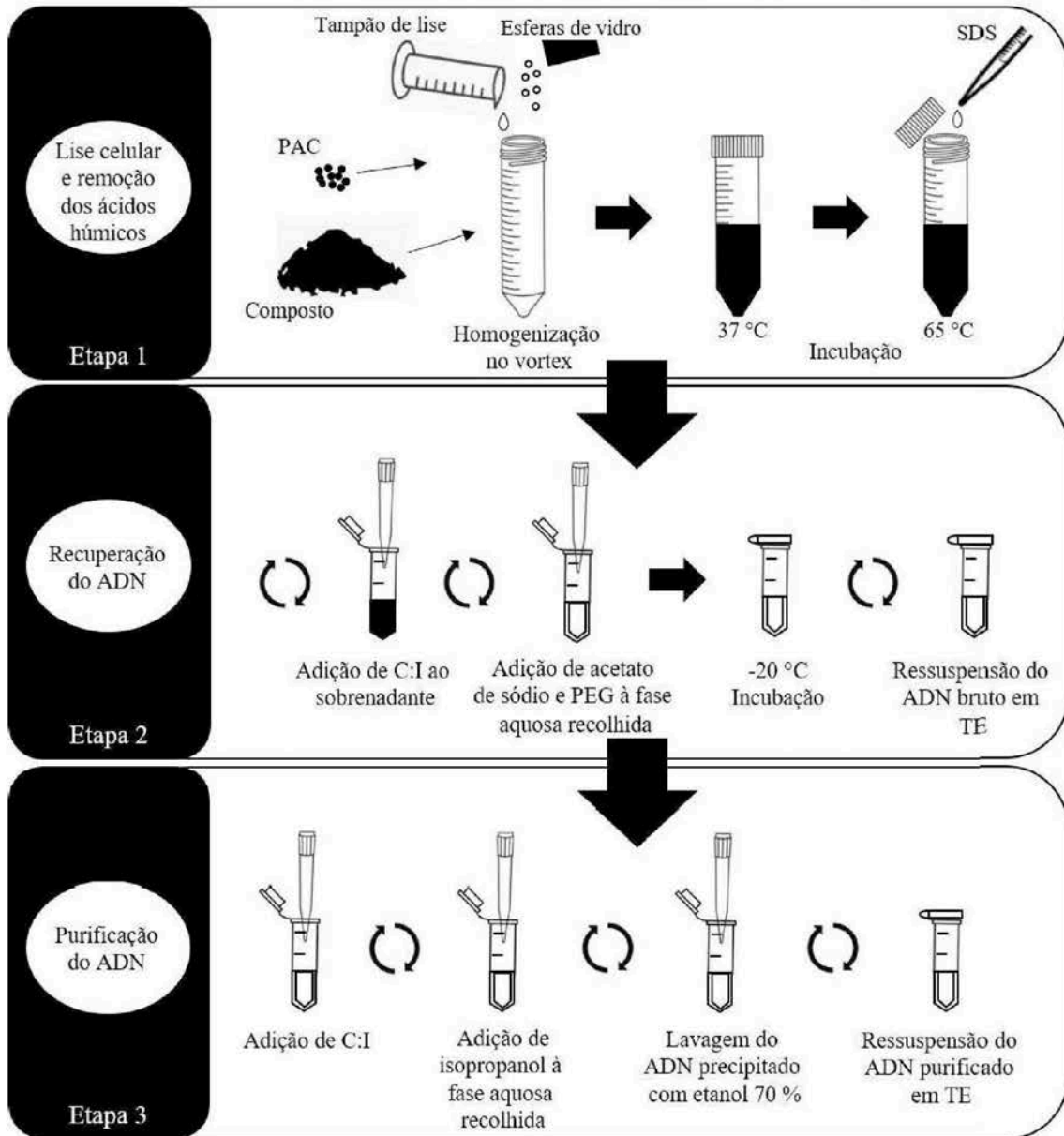
numa proporção 24:1 (v/v), a mistura é suavemente misturada à mão e depois centrifugada entre 6000 - 12000 g durante 5 - 30 minutos na etapa de purificação.

19. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o solvente de precipitação utilizado é aproximadamente 1 volume de isopropanol frio e a mistura é homogeneizada suavemente à mão.

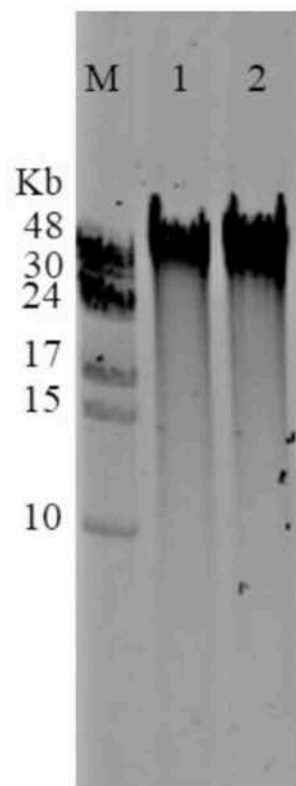
20. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o ADN precipitado é recuperado por centrifugação entre 6000 - 12000 g, durante 5 - 30 minutos, lavado posteriormente com etanol a 70% (v/v) e ressuspenso em tampão 1X TE.

21. Kit de extração de ADN caracterizado por compreender seis soluções diferentes resultantes de misturas previamente preparadas para obter uma extração eficiente de ADN, tal como definido em qualquer reivindicação de 1 a 20.

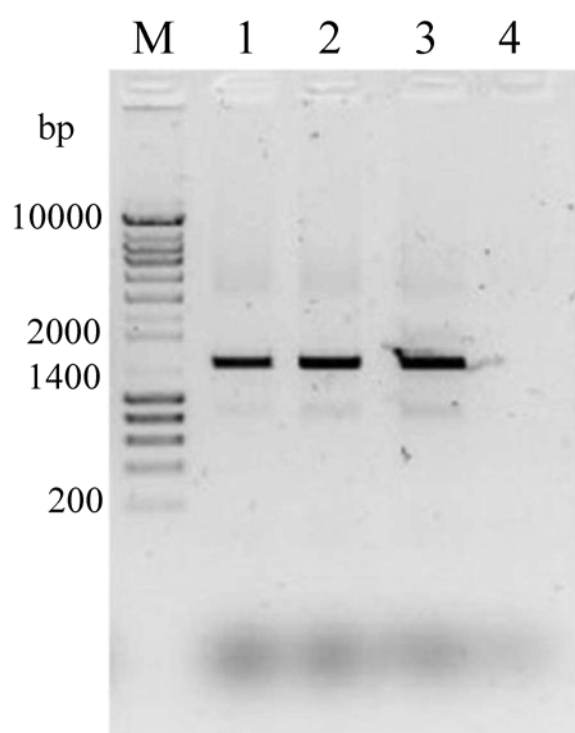
**DESENHOS**



**FIGURA 1**



**FIGURA 2**



**FIGURA 3**