

Avaliação Fenológica de Frutos de Café a partir da Quantificação da Expressão de Genes Marcadores – proposta de uma ferramenta complementar



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Café
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 8

Avaliação Fenológica de Frutos de Café a Partir da Quantificação da Expressão de Genes Marcadores – proposta de uma ferramenta complementar

*Mirian Perez Maluf
Oliveiro Guerreiro Filho*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Café

Pq. Estação Biológica (Pq EB) Av w3 N final
Ed Sede Embrapa, 3º andar,
70770-901, Brasília, Df
Fone: (61) 3448 1910
Fax: (61) 3448 4425
Home page: www.embrapa.br/cafe
E-mail (sac): <http://sac.sapc.embrapa.br>

Comitê de Publicações da Unidade Responsável

Presidente: Maria Isabel de Oliveira Penteado
Secretário-Executivo: Adriana Maria Silva Macedo
Membros: Paulo Cesar Afonso Júnior
Carlos Henrique Siqueira de Carvalho
Mauricio Sergio Zacarias

Supervisão editorial: Thiago Farah Cavaton
Victoria Sá Rêgo Haidamus
Revisor de texto: Flávia Raquel Bessa Ferreira

1ª Edição

1ª impressão (2011): 300 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Café**

M261a

Maluf, Mirian Perez

Avaliação fenológica de frutos de café a partir da quantificação da expressão de genes marcadores: proposta de uma ferramenta complementar / Mirian Perez Maluf; Oliveira Guerreiro Filho. Brasília, DF: Embrapa Café, 2011. (Documentos; 8).
30 p. : il.

Referências: p. 30.

ISSN 1678-1694

1. Café – Quantificação da expressão de genes. 2. Café – Programas de Melhoramento.
I. Guerreiro Filho, Oliveira. II. Documentos. III. Título.

CDD 633.73

Autores

Mirian Perez Maluf

Doutorado, Pesquisadora, Embrapa Café —
mirian.maluf@embrapa.br

Oliveiro Guerreiro Filho

Doutorado, Pesquisador, Centro de Café / Instituto
Agrônômico (IAC) — oliveiro@iac.sp.gov.br

Apresentação

Entre as técnicas de biologia avançada, as que permitem a quantificação da expressão de genes em diversas situações biológicas têm tido importância crescente para Programas de Melhoramento. Essas técnicas, entre outras coisas, permitem avaliar genes-candidatos para transferência para outras plantas, genes que servirão como marcadores para seleção assistida de características desejáveis, ou então selecionar genes-marcadores que servirão para marcar uma fase de desenvolvimento específica.

Uma das dificuldades para seleção de cafeeiros com características organolépticas definidas é a definição das fases fenológicas durante a frutificação do cafeeiro, associadas com os processos fisiológicos de maturação e amadurecimento dos frutos.

Este documento, de cunho prático para uso em laboratórios de biotecnologia, propõe o uso de modernas técnicas de biologia molecular para a determinação do desenvolvimento fenológico de frutos de café, fornecendo o passo a passo de como aplicá-las.

A Embrapa Café disponibiliza mais essa ferramenta, esperando que seja de utilidade aos pesquisadores e outros interessados no avanço da cafeicultura brasileira.

Paulo Cesar Afonso Junior
Gerente Geral
Embrapa Café

Sumário

Avaliação Fenológica de Frutos de Café a Partir da Quantificação da Expressão de Genes Marcadores – proposta de uma ferramenta complementar.....	9
Introdução.....	9
Amostragem.....	11
Equipamentos.....	12
Reagentes.....	12
Procedimentos.....	13
Soluções e tampões para estoque.....	14
Extração de RNA.....	16
Eletroforese em gel de agarose e formaldeído.....	17
Medida de Absorbância em espectrofotômetro.....	18
Síntese de cDNA.....	19
Seleção de oligos.....	21
PCR em tempo-real.....	23
Quantificação da expressão dos genes-marcadores....	24
Resultados esperados.....	27
Exemplo prático.....	28
Referências.....	30

Avaliação Fenológica de Frutos de Café a partir da Quantificação da Expressão de Genes Marcadores – proposta de uma ferramenta complementar

Mirian Perez Maluf

Oliveiro Guerreiro Filho

Introdução

Entre as técnicas de biologia avançada desenvolvidas nos últimos 10 anos, as que permitem a quantificação da expressão de genes em diversas situações biológicas têm tido importância crescente para Programas de Melhoramento. A partir dessas análises quantitativas, é possível identificar genes diferencialmente expressos associados às mais diversas condições biológicas e agrônômicas, tais como resistência a estresses bióticos e abióticos, produtividade, composição química, e também com estágios de desenvolvimento específicos, tecidos e órgãos determinados, entre outras. A partir deste tipo de estudo, pode-se avaliar genes-candidatos para transferência para outras plantas, genes que servirão como marcadores para seleção-assistida de características desejáveis, ou então selecionar genes-marcadores que servirão para marcar uma fase de desenvolvimento específica.

Uma das dificuldades para seleção de cafeeiros com características organolépticas definidas é a definição das fases fenológicas durante a frutificação do cafeeiro, associadas com os processos fisiológicos de maturação e amadurecimento dos frutos. Atualmente a identificação dos estádios de desenvolvimento dos frutos, especialmente em programas de melhoramento, é feita através da utilização de uma escala fenológica visual proposta por Pezzopane et al (2003). Neste contexto, a metodologia apresentada aqui propõe a quantificação da expressão absoluta de 4 genes-alvo, selecionados a partir de análises moleculares em frutos de cafeeiros ao longo de 3 colheitas (Gaspari-Pezzopane et al, 2011), como ferramenta auxiliar na definição dos estágios de desenvolvimento dos frutos de café. A expressão desses genes foi caracterizada em 3 fases de maturação, expansão, verde e cereja, em frutos colhidos de 4 cultivares distintos, Mundo Novo, Catuaí Vermelho, Icatu Vermelho e Obatã, todos plantados na mesma época em um lote experimental na Fazenda Santa Elisa do IAC, Campinas/SP. O perfil de variação de expressão foi estabelecido para cada fase, e o valor indicativo de cada gene - marcador foi determinado pela relação entre os valores dos genes-alvo e o valor do gene - controle endógeno.

Para a quantificação da expressão gênica, é utilizada a técnica de PCR em tempo-real, atualmente a mais utilizada em rotinas de laboratório. A técnica é uma combinação de 3 metodologias: (1) RT, ou transcrição reversa, onde a partir do RNA total extraído de material vegetal é sintetizado o cDNA, complementar a todo o mRNA (RNA mensageiro) presente na amostra; (2) PCR, ou reação de polimerização em cadeia, onde os genes-alvo são amplificados a partir da coleção de cDNAs utilizando sequências iniciadoras específicas, ou oligos; e (3) detecção e quantificação de fluorescência contida nos fragmentos amplificados. As etapas (2) e (3) são realizadas simultaneamente, em um equipamento desenvolvido para esse fim. Neste caso, a quantificação do número de transcritos é feita de maneira indireta, a partir da comparação do número de transcritos amplificados entre 2 amostras, ou 2 genes distintos. Assim, amostras onde a quantidade inicial de um transcrito específico é maior, amplificarão um número estabelecido de fragmentos em um menor número de ciclos de amplificação.

Amostragem

A quantificação da expressão de genes a partir dos procedimentos descritos aqui pode ser realizada em vários tecidos e órgãos do cafeeiro. De maneira geral, a estratégia de amostragem será definida pelos objetivos da pesquisa. Por exemplo, para estudos de expressão de genes ao longo do desenvolvimento de frutos, é necessário marcar os ramos na época do florescimento e coletar os frutos nas fases fenológicas definidas por Pezzopane et al. (2003) para maturação dos frutos. Para essa análise, serão coletadas as fases expansão, verde e cereja, a partir de identificação visual.

De maneira geral, recomenda-se a coleta de tecidos e órgãos saudáveis, que não apresentem sinais de lesões, dano mecânico, senescência ou outro aspecto que evidencie infecção por espécies patogênicas. No ato da coleta, o material vegetal deve ser colocado em um recipiente adequado para conservação e imediatamente congelado em Nitrogênio líquido. Cada fase fenológica deve ser coletada separadamente e transferido para tubos de polipropileno (50 ml). Após congelamento, o material deve ser armazenado em ultra-freezer a -80°C. Esse procedimento é essencial para garantir a preservação do material vegetal, evitando a degradação de ácidos nucleicos instáveis, como o mRNA.

O tempo de conservação a -80°C depende do tipo de tecido e da qualidade fito-sanitária do material coletado. Em nosso laboratório, já conseguimos extrair RNA de boa qualidade a partir de tecidos congelados há mais de 2 anos.

- Dica: marque o recipiente de congelamento utilizando canetas de marcação permanente e resistente a baixas temperaturas. Identifique todos os recipientes antes da coleta do material.

Equipamentos

- Banho-maria com aquecimento
- Centrífuga refrigerada, com capacidade de até 15.000 X g
- Conjunto de micropipetas (volume entre 0,5 – 1000 μ l)
- Cuba para eletroforese com acessórios (pentes e moldes)
- Espectrofotômetro
- Fonte de voltagem
- Fotodocumentador de géis
- Freezer -20°C
- Freezer -80°C
- Máquina de gelo (opcional)
- Microcentrífuga
- Plataforma de Amplificação e Detecção de Sequências em Tempo-real
- Sistema de purificação para obtenção de água ultra-pura
- Termociclador

Reagentes

Todos os reagentes devem ter um nível de pureza alto, sem contaminantes. Recomenda-se o uso de reagentes de marcas com tradição na produção de materiais quimicamente puros, tais como Sigma, Merck, Fisher, Aldrich, entre outras.

Para soluções:

- Acetato de sódio, AcNa = CH_3COONa
- Agarose
- Azul de Bromofenol
- β - Mercaptoetanol
- BrEt = Brometo de Etídeo
- CTAB= Cetyl Trimetil Amonio Brometo
- Clorofórmio
- DEPC= Dietil Pirocarbonato

- EDTA = Etilenodiamina tetra acetato dissódico
- Etanol
- Formaldeído 37%
- Formamida
- Glicerol
- HCl = Hidróxido de cloro
- H₂O₂ = Peróxido de hidrogênio (Água oxigenada)
- NaCl = Cloreto de sódio
- NaOH = Hidróxido de sódio
- LiCl = Cloreto de lítio
- MOPS = Ácido 3-morfolino-propanossulfônico
- PVP = Polivinilpirrolidona
- Tris = Tris(hidroximetil)aminometano

Para manipulação ácidos nucleicos:

- DTT = Dithiothreitol
- dNTP= Dioxiribonucleotídeo trifosfato
- MgCl₂= Cloreto de magnésio
- Enzima DNAase
- Enzima Taq Polimerase
- Enzima transcriptase reversa
- Enzima RNAase
- Oligonucleotídeos gene-específicos
- Kit para PCR real-time contendo *Sybr Green Dye e ROX* (referência passiva)

Procedimentos

Uma vez que a maioria dos procedimentos descritos a seguir é amplamente utilizada em laboratórios de Biologia Molecular, recomenda-se a leitura do Manual de Laboratório escrito por Sambrook & Fritsch (2001) para maiores detalhes das técnicas. O preparo das soluções estoques é detalhado a seguir.

Soluções e tampões para estoque

- Tampão 1 molL⁻¹ Tris-HCl pH 8,0
- Solução 5 molL⁻¹ NaCl
- Solução 0,5 molL⁻¹ EDTA pH 8,0
- Solução 12 molL⁻¹ Cloreto de lítio (LiCl)
- Solução 3 molL⁻¹ Acetato de Sódio (CH₃COONa), pH5,0
- Solução 3% Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
- Solução 0,2% (v/v) Diethyl pirocarbonato (DEPC)
- Solução Brometo de Etídio (BrEt) 10mg/ml
- Tampão de extração - Composição final: 2% (w/v) CTAB; 2% (w/v) PVP; 100mmolL⁻¹ Tris-HCl pH 8,0 ; 25mmolL⁻¹ EDTA; 2molL⁻¹ NaCl e 2% (v/v) β-mercaptoetanol
- Tampão MOPS 10X
- Tampão de gel/corrída 1X MOPS - Composição final: MOPS 1X; 8mmolL⁻¹ Acetato de Sódio/ pH5,0; 1mmolL⁻¹ EDTA, pH 8,0
- Tampão da amostra - Este tampão é uma mistura de tampões, com a seguinte composição: Tampão 1 – 1X MOPS; 17,5% (v/v) Formaldeído; 50% (v/v) Formamida; 4µg/ml Brometo de Etídeo
Tampão 2 – 50% (v/v) Glicerol; 2,5 mmolL⁻¹ EDTA; 0,25% (w/v) azul de bromofenol

Extração de RNA

O sucesso da análise depende totalmente da qualidade do RNA extraído. Um RNA de boa qualidade é aquele que possui o mínimo de contaminações com proteínas e compostos fenólicos. Dentre as proteínas, a RNAase é o contaminante que resulta em degradação da amostra. Outras proteínas interferem nos procedimentos subsequentes, como síntese de cDNA e PCR.

Para evitar essas contaminações, algumas precauções devem ser tomadas:

Mantenha separados todos os materiais e reagentes para trabalhos com RNA.

Evite tocar sem luvas qualquer um desses materiais, uma vez que as mãos são ricas em RNAsases.

Materiais descartáveis devem ser comprados já esterilizados e livres de RNase.

Todo material de trabalho (ponteiras, tubos, cubas, espátulas, almofariz, etc) deve ser tratado com solução 0,2% DEPC, durante 2 horas. Após este tempo, a solução é descartada, e o material autoclavado.

Toda solução e tampão que estiver em contato com a amostra deve ser tratada com 0,2% v/v DEPC. Para tal, adicione a quantidade correspondente de DEPC à solução, agite vigorosamente a mistura até a completa dissolução do reagente, e deixe na bancada por 2 horas. Após este tempo as soluções devem ser autoclavadas regularmente.

Cubas, pentes e moldes de géis devem ser tratadas com solução 3% H₂O₂ e enxaguadas com H₂O tratada com DEPC.

1. Colocar entre 0,5 – 1 g de frutos em um cadinho de porcelana. Adicionar nitrogênio líquido e macerar vigorosamente, para obtenção de um pó fino.

- Dica: É importante manter o tecido congelado durante a maceração, adicionando LN₂ sempre que necessário.

2. Transferir o pó macerado para um tubo plástico contendo 10 ml do tampão de extração e incubar a mistura a 65°C por 20 minutos.

- Dica: a quantidade de material vegetal é fundamental para definir o volume de tampão de extração. Se a quantidade de tampão for pouca, o material se oxidará rapidamente e o RNA será degradado. Se a amostra escurecer, adquirindo tonalidade marrom, é sinal que ocorreu oxidação da amostra.

3. Adicionar 1 volume de clorofórmio, misturando delicadamente até que o conteúdo esteja homogeneizado.
4. Centrifugar a mistura a 10.000 X g por 15 minutos.
5. Verificar a formação de 2 fases: aquosa e orgânica. Transferir o sobrenadante (fase aquosa) para novo tubo, evitando aspirar ao precipitado da interface. Adicionar 1 volume de clorofórmio, homogeneizando a mistura como anteriormente.
6. Centrifugar a mistura a 10.000 X g por 15 minutos.
7. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e repetir as etapas 3-5 até que nenhuma interface seja observada entre as 2 fases.
 - Dica: nessa etapa, ocorre uma redução do volume da fase aquosa, por isso o volume de clorofórmio deve ser ajustado a cada lavagem.
8. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar solução de 12molL⁻¹ LiCl até a concentração final de 2,5molL⁻¹ LiCl.
9. Incubar a solução a 4 °C por 12h ou por toda noite.
10. Centrifugar a 12.000 X g a 4 °C por 30 minutos.
11. Observar a formação de um precipitado no fundo do tubo, o “pellet”. Descartar o sobrenadante.

- Dica: às vezes o “pellet” apresenta aspecto gelatinoso, transparente, e não é facilmente visualizado.

12. Lavar o pellet com 500 μL de $2,5\text{molL}^{-1}$ LiCl e centrifugar a $12.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos.

13. Remover o sobrenadante cuidadosamente e secar o pellet à temperatura ambiente.

- Dica: após a lavagem, o pellet pode se desprender da parede do tubo; portanto muito cuidado ao remover o sobrenadante para não descartar o RNA também.

12. Ressuspender o pellet em 100 μL de água ultra-pura.

Após a ressuspensão do RNA, a integridade e qualidade química devem ser avaliadas. Para verificação da integridade física, é utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose e formaldeído. Já a qualidade química e a quantificação são determinadas por meio de medições da absorbância ótica em espectrofotômetro.

Eletroforese em gel de agarose e formaldeído

Para preparar o gel, adicionar ao volume de tampão a quantidade correspondente de agarose para que a concentração final seja 1,5% (w/v). Quando a solução estiver morna adicionar 5% v/v de formaldeído 37%. Derramar o gel no molde apropriado contendo os pentes. Assim que o gel solidificar completamente, remover o pente e colocar o gel na cuba de eletroforese.

- Dica: Cuidado ao manusear o gel após a adição do formaldeído, pois esse fica frágil.

Tampão da amostra:

Tampão 1: 1X MOPS; 17,5% Formaldeído; 50% Formamida; 0,4µg/ml Brometo de Etídeo.

Tampão 2: 50% Glicerol; 2,5 mmolL⁻¹ EDTA; 0,25% (w/v) azul de bromofenol.

Para cada 5µl de RNA total, adicionar 10µl do tampão 1 e 4µl do tampão 2. Desnaturar a 65°C por 7min. Deixar no gelo até o momento de aplicar no gel. Aplicar as amostras no gel. Conectar a cuba à fonte de voltagem e correr a 50V/cm. Ao final da corrida, retirar o gel da cuba, visualizar e documentar os resultados utilizando um fotodocumentador de géis.

Um resultado típico de um gel de RNA é mostrado na figura 1. Devem ser visualizadas 2 bandas intactas, correspondentes aos RNAs ribossômicos, e um rastro no fundo, correspondente ao mRNA.

Medida de Absorbância em espectrofotômetro

1. Em um tubo misturar 5 µl da amostra + 995 µl de H₂O ultra-pura. Misturar bem com a pipeta.
2. Transferir a mistura para uma cubeta apropriada para absorção de luz U.V.

3. Calibrar o espectrofotômetro utilizando 1 ml da água utilizada para ressuspender o RNA.

4. Ler o espectro de absorvância entre os comprimentos de onda de 200-300nm.

Um RNA com qualidade química ideal apresenta uma relação $Abs_{260}/Abs_{280} > 1,8$. Além disso, o gráfico com os valores de Abs deve ter o formato de um sino (Figura 2), indicando que o RNA é a molécula presente em maior quantidade na amostra.

Síntese de cDNA

A síntese de cDNA é feita a partir de RNA total, utilizando uma enzima de origem viral, a transcriptase reversa, ou RT. Existem vários tipos de enzimas disponíveis comercialmente e a maioria delas é adequada para essa síntese. O importante é que a enzima seja livre de RNAases.

Outro ponto importante é a verificação da ausência de DNA contaminante na amostra de RNA total. A presença de DNA pode levar a resultados errôneos, uma vez que os oligos gene-específicos poderão se ligar também a sequências correspondentes no DNA. Para garantir que sua amostra de RNA está livre de DNA, é necessário tratar a amostra com DNAase, livre de RNAase.

Tratamento com DNAase:

1. Adicione em um tubo 0,5ml livre de RNAase:

- 1 μg amostra RNA
- 1 μl 10x Tampão de reação DNAase I
- 1 μl DNAase I, Amp Grade 1 U/ μl
- H₂O para 10 μl

2. Incube, por 15 minutos, à temperatura ambiente.

- Dica: não ultrapassar esse tempo, pois altas temperaturas e longo tempo de incubação podem iniciar a hidrólise de RNA dependente de Mg⁺⁺.

3. Inative a DNAase I adicionando 1 μl de EDTA 25mmolL⁻¹ à reação.

4. Aqueça a 65°C por 10 min.

O RNA está pronto para as reações.

Transcrição reversa:

1. Em um tubo de 0,5 ml combinar os seguintes componentes:

- 1 μl oligo dT
- 500ng RNA
- 2 μl dNTP mix 10mmolL⁻¹
- H₂O para 12 μl

2. Incube a mistura a 65°C por 5min, para desnaturar o RNA, e após este tempo transfira o tubo imediatamente para o gelo.

3. Adicione ao tubo a seguinte mistura de reagentes:

- Dica: para evitar pipetar volumes muito pequenos, faça mais de 1 reação ao mesmo tempo e prepare um “master mix” contendo quantidades equivalentes de cada reagente a seguir. Depois distribua 8 μl em cada tubo contendo o RNA.
- 4 μl de Tampão da Enzima
- 1 μl DTT 0,1 molL⁻¹
- 1 μl RNaseOUT (40U/ μl)
- 1 μl Enzima RT (15 U/ μl)
- 1 μl H₂O

4. Coloque os tubos em Termociclador com a seguinte programação: 50°C por 60min; 85°C por 5min.

5. Adicione 1 μl de RNAase H e incube a 37°C por 20min.

6. Quantifique o cDNA sintetizado através de leitura da Abs260nm, como descrito anteriormente. Utilize apenas 1 μl da solução.

- Dica: para evitar degradação do cDNA devido a congelamento/ descongelamento das amostras, recomenda-se alíquotar o cDNA em tubos contendo 4-5 μl (50 ng/ μl) da solução. Essa quantidade é suficiente para 5 reações de PCR, dependendo da quantidade inicial do transcrito em estudo.

7. Manter o cDNA sintetizado a -20°C até o uso seguinte.

Seleção de oligos

Os oligos são moléculas de DNA contendo entre 15-25 pares de base (pb) que atuam como iniciadores da reação de síntese de nova

fita de DNA, na reação de PCR. Apesar do tamanho reduzido, essas sequências são desenhadas de maneira que reconheçam e se anelem a apenas 1 tipo de sequência de DNA. É essa especificidade que permite a amplificação dos transcritos gênicos determinados. Há vários aplicativos disponíveis na rede para desenhar oligos a partir de uma dada sequência de DNA. Entre eles, se recomenda o Primer 3 (primer3.sourceforge.net).

Para as análises de qRT-PCR, os oligos têm especificações próprias para cada plataforma utilizada. Recomenda-se que os parâmetros para seleção de oligos sigam os critérios indicados pelo fabricante da plataforma.

São utilizados oligos correspondentes aos genes:

1. α -galactosidase (α -gal): F- CAGGAACCGAGGATTACA e
R- AGTTCTGCCCAACAGTCA

2. Isocitrato liase (icl): F- GGCACAGCATCAAGAACCT e
R- ATCCAGTATCGCCATCAGC

3. Receptor de etileno 3 (etr-3): F- GAGATGGTCCCTGCATGTTA e
R- TTGCTCGTCTTGACCATAGC

4. Cafeína sintase (cs): F-GCCGAATGCTCCTTACTTTC e
R- CAGGATACAGGGGAATGGGATC

5. Glicerol 3-fosfato desidrogenase (gpdh): F-TTGAAGGGCGGTGCAAA
e R- AACATGGGTGCATCCTTGCT

Outro aspecto importante é a seleção de genes que possam atuar como controle endógeno da expressão. Ou seja, são genes cujo nível de expressão não varia entre as amostras em avaliação e, portanto, são utilizados como gene normalizador da quantidade inicial de transcritos de cada amostra. Em café, vários genes são utilizados como controle endógeno, sendo os mais comuns os denominados actina, *gpdh* e *adh* (álcool desidrogenase). Nesse trabalho, foi utilizado o gene *GPDH* como controle endógeno.

PCR em tempo real

O PCR quantitativo (qPCR) ou PCR em tempo-real (RT-PCR) é um método que permite a quantificação indireta de transcritos presentes em amostras de RNA. A base do método é comum à reação de polimerização em cadeia, PCR, amplamente descrita na literatura (Sambrook & Fritsch, 2001). A diferença é que nessa reação é incorporado algum tipo de fluorocromo que, ao ser excitado por uma fonte de luz, irá emitir fluorescência. Esta é captada por filtros específicos e quantificada por meio de leituras de absorbância. Todo esse processo ocorre em um equipamento termociclador específico para essa finalidade. A análise dos resultados baseia-se na idéia de que quanto maior o número de fragmentos amplificados, maior será a quantidade de fluorescência emitida.

Dois tipos de marcação podem ser utilizados. O primeiro usa fluorocromos intercalantes, de maneira que todo fragmento amplificado irá emitir fluorescência. O reagente mais comum para essa finalidade é o SybrGreen. No segundo tipo, são utilizadas sondas específicas para cada gene em estudo marcadas com fluorocromos. Nesse protocolo, descreve-se o método de marcação não-específica, utilizando-se o SybrGreen. Existem vários *kits* comerciais para realização dessa etapa, contendo os reagentes balanceados e com concentrações ótimas para uma reação com alta eficiência. Como os *kits* já contêm todos os reagentes necessários à amplificação, as condições de reação são definidas pelos fabricantes.

1. Para cada tubo adicione:

- 50 ng de cDNA
- 1X SYBR Green Mix UDG
- 3 mmolL⁻¹ de MgCl₂
- 200 mmolL⁻¹ de cada um dos oligos gene-específicos
- H₂O para 15µl

2. Misture delicadamente antes de colocar na Plataforma RT.

- Dica: faça duplicatas ou triplicatas de cada amostra e de cada gene. Sempre coloque uma amostra em branco, ou seja, sem a adição do cDNA. O uso do gene controle é obrigatório em toda reação.

3. Para a Plataforma ABI Prism 7700 Sequence Detection System (Perkin-Elmer Applied Biosystem), as condições de amplificação são: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 2 minutos e 40 ciclos de 95° C por 15 segundos e 60° C por 30 segundos.

4. Acrescente ao programa a opção da curva de dissociação. Essa etapa é necessária para demonstrar se realmente foi amplificado um único fragmento.

Quantificação da expressão dos genes-marcadores

Para a análise dos resultados e cálculo da concentração e quantificação absoluta de transcritos, cada plataforma possui seu próprio aplicativo. No exemplo mostrado aqui, utiliza-se o método baseado nos valores de Ct onde, Ct = o número do ciclo da reação de PCR onde é feita a leitura de absorbância para as análises. Esse valor é definido a cada corrida, utilizando-se uma linha base de leitura, o *threshold*, que está no mesmo nível para todas as amostras.

O valor absoluto da expressão gênica é definido como a relação entre o Ct do gene - marcador e o Ct do gene - controle endógeno. Ou seja, $Q_{abs} = Ct_{gene-alvo} / Ct_{gene-controle}$, sendo o gene - alvo um dos genes marcadores selecionados e o gene - controle um dos endógenos definidos.

Para cada gene-marcador, o valor dessa relação foi definido experimentalmente em cada uma das fases amostradas, como mostrado na tabela abaixo:

Tabela 1- Valores-referência da quantificação de transcritos de gene-marcadores para cada fase de maturação

Gene - marcador	Fase de Maturação		
	Expansão	Verde	Cereja
α -gal	1,3056 ± 0,019	1,001±0,025	1,2197±0,044
icl	1,5739±0,054	1,2936±0,011	1,1548±0,057
etr3	1,405±0,019	1,3445±0,024	1,1882±0,045
cs	1,0005±0,015	0,9505±0,031	1,344±0,036

É importante lembrar que os valores de Q_{abs} são inversamente proporcionais ao padrão de expressão do gene. Ou seja, quanto maior for o valor de Q_{abs} , menor será a quantidade de transcritos na amostra, indicando que o gene está ativado ou reprimido. A explicação experimental para isso é que quanto maior for o número de transcritos correspondentes a um gene em uma amostra, um número menos de ciclos (Ct) será necessário para atingir a absorbância estabelecida no *threshold*.

Resultados esperados

A figura 1 apresenta a foto de um gel de RNA total, após eletroforese. O RNA total foi extraído de raízes e frutos de café. Podem ser visualizadas 2 bandas bem definidas, correspondentes às subunidades de RNA ribossômico.

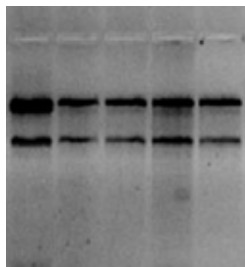


Fig. 1. RNA total extraído de frutos de café

Os seguintes valores de absorvância foram obtidos com a leitura de uma dessas amostras em espectrofotômetro:

mm	abs
220	0,02
240	0,06
260	0,15
270	0,11
280	0,08
300	0,03

Para cálculo da qualidade do RNA, utilizamos a relação $Abs_{260} / Abs_{280} = 1,875$.

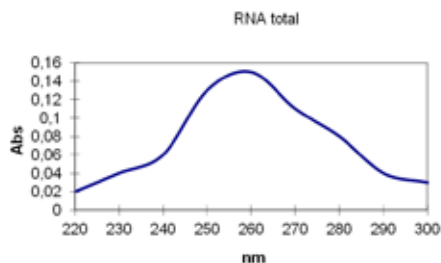


Fig. 2. Perfil de absorvância do RNA extraído de frutos

A seguir é mostrado gráfico relativo a análises da expressão de genes por meio de PCR em tempo real.

A figura 3 apresenta um exemplo de espectro de absorvância obtido na análise de um grupo de genes expressos em frutos maduros de café. Cada curva colorida representa a evolução da absorvância ao longo dos ciclos da reação de PCR de uma amostra. A linha dupla horizontal (indicada por uma seta) representa a linha de “threshold”, onde a leitura do ciclo Ct foi realizada para todas as amostras. Essa linha pode ser definida automaticamente ou manualmente, de maneira a minimizar os desvios padrões entre as duplicatas de cada amostra.

Uma boa reação para análise é aquela na qual as duplicatas de uma amostra apresentam o mesmo perfil de absorvância, ou seja, o espectro de todas se sobrepõe. Em termos numéricos, essa qualidade é definida pelo valor semelhante de Ct, com valores de desvio padrão inferiores ao limite de 1%.

Outro valor importante para definir a qualidade do cDNA amostrado é o valor de Ct do gene - controle endógeno, que deve ficar entre 18 e 23 ciclos, indicando que a quantidade inicial de transcritos para esse gene é adequada. Um valor de Ct muito elevado, em torno de 28 e 30, indica que a quantidade inicial de transcritos do gene é baixa, o que não é desejável para genes-controle. Já valores de Ct elevados para genes-alvo podem indicar que o gene tem baixo número inicial de transcritos.

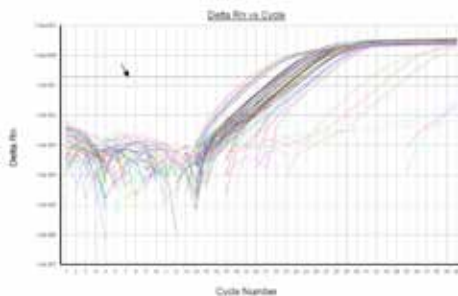


Fig. 3. Espectro de absorvância obtido a partir da amplificação de transcritos gênicos em frutos cereja de café. Os valores de Abs foram obtidos a cada ciclo de amplificação (Cycle number) para cada amostra individualmente e registrados em valores logarítmicos (Delta RN). A seta indica a linha do “treshold”.

Outro parâmetro importante para determinar a qualidade da amostra é dado pela curva de dissociação. Essa indica se apenas um tipo de transcrito é amplificado em cada amostra. A Figura 4 é um exemplo de uma curva de dissociação obtida a partir da amplificação de transcritos do gene GAPDH. Em todas as amostras, o produto de amplificação apresenta a mesma temperatura de dissociação, indicando que é constituído de uma sequência única.

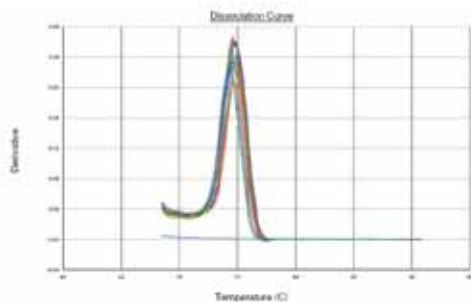


Fig. 4. Curva de dissociação para transcritos amplificados com oligos específicos para o gene GAPDH.

Exemplo prático

Em experimentos de RT-PCR, amostras de RNA, extraídas de frutos coletados em diferentes tempos, apresentaram os seguintes valores de Ct para os genes-marcadores:

Amostra	Ct Gene				
	GAL	ICL	ETR	CS	GPDH
1	21,25	20,69	20,16	23,135	17,145
2	22,89	29,71	24,76	17,02	17,65
3	18,23	25,125	25,67	16,52	18,08

Assim, calculando os valores da relação entre gene-marcador/gene-controle, e comparando os valores obtidos com os valores-referência descritos na Tabela 1, temos:

Amostra	Ct gene/ Ct GPDH				Fase fenológica
	GAL	ICL	ETR	CS	
1	1,239	1,207	1,176	1,349	Cereja
2	1,296	1,683	1,403	0,964	Expansão
3	1,008	1,390	1,420	0,914	Verde

Comparando-se os valores obtidos para a amostra de RNA desconhecido com os valores-referência descritos na Tabela 1, pode-se identificar a fase fenológica à qual corresponde cada amostra. Para alguns genes, como por exemplo, o ICL da amostra 2, o valor obtido para a relação Ct gene/Ct GPDH se encontra fora da faixa estabelecida para o valor-referência. Os valores da tabela são referências e, apesar de terem sido determinados a partir de quantificações de amostras colhidas tanto em diferentes safras quanto de diferentes cultivares, pequenas variações em torno desse valor são esperadas em decorrência de prováveis diferenças ambientais. No entanto, essas variações não devem ser muito altas e tampouco tão significativas que resultem em valores que correspondam a mais de uma fase fenológica. Assim, para eliminar esse risco, é essencial que sejam avaliados os quatro genes-marcadores em uma amostra. A classificação da fase fenológica é então determinada por esta avaliação conjunta.

Referências

GASPARI-PEZZOPANE, C., BONTURI, N., GUERREIRO-FILHO, O., FAVARIN, J.L., MALUF, M.P. (2011) **Gene expression during coffee fruit development and identification of candidate markers for phenological stages**. Submetido para publicação.

PEZZOPANE JRM, JÚNIOR MJP, THOMAZIELLO RA, CAMARGO MBP (2003) **Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica**. *Bragantia* 62:499-505.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. (2001) **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press.



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

