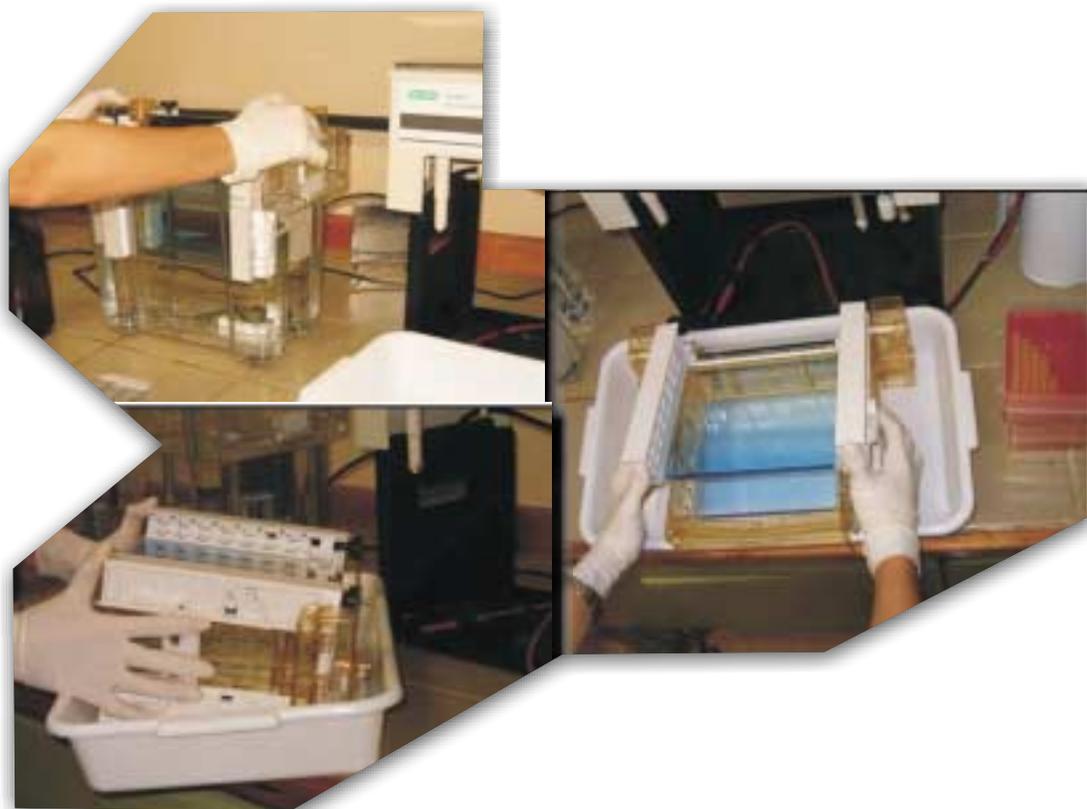


Avaliação da Diversidade Microbiana em Amostras de Solos: Técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial)



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luís Carlos Guedes Pinto

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive

Membros

Diretoria-Executiva

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Herbert Cavalcante de Lima

Mariza Marilena T. Luz Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Solos

Celso Vainer Manzatto

Chefe Geral

Aluísio Granato de Andrade

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

David Dias Moreira Filho

Chefe Adjunto de Administração



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Solos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1517-2627

Dezembro, 2004

Documentos 68

Avaliação de Diversidade Microbiana em Amostras de Solos Técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial)

Marcela Cristina Rosas Aboim

Joyce Costa Barbosa

Heitor Luiz da Costa Coutinho

Alexandre Soares Rosado

Rio de Janeiro, RJ
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Solos

Rua Jardim Botânico, 1024 Jardim Botânico. Rio de Janeiro, RJ

Fone: (21) 2274.4999

Fax: (21) 2274.5291

Home page: www.cnps.embrapa.br

E-mail (sac): sac@cnps.embrapa.br

Supervisor editorial: *Jacqueline Silva Rezende Mattos*

Normalização bibliográfica: *Cláudia Regina Delaia*

Revisão de texto: *Jacqueline Silva Rezende Mattos*

Editoração eletrônica: *Pedro Coelho Mendes Jardim*

1ª edição

1ª impressão (2004): online

Todos os direitos reservados.

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

Avaliação de diversidade microbiana em amostras de solos: técnica do PCR/DGGE
(Protocolo Laboratorial) / Marcela Cristina Rosas Aboim . - Rio de Janeiro :
Embrapa Solos, 2004.

31 p. - (Embrapa Solos. Documentos, n. 68)

ISSN 1517-2627

1. Biologia Molecular - Microbiologia Ambiental - Brasil - Rio de Janeiro. 2.
Diversidade Microbiana - Microbiologia Ambiental - Brasil - Rio de Janeiro. I. Aboim,
Marcela Cristina. II. Barbosa, Joyce Costa. III. Coutinho, Heitor Luiz da Costa. IV.
Rosado, Alexandre Soares. V. Embrapa Solos (Rio de Janeiro). VI. Série.

CDD (21.ed.)630.2

© Embrapa 2004

Autores

Marcela Cristina Rosas Aboim

Bióloga, Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Vegetal, UFRJ.

Joyce Costa Barbosa

Bióloga, Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ecologia, UFRJ.

Heitor Luiz da Costa Coutinho

Eng. Agron. Ph.D. Embrapa Solos - Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Rua Jardim Botânico, 1.024.
CEP: 22.460-000. Rio de Janeiro-RJ.

Alexandre Soares Rosado

Microbiólogo, Ph.D., professor adjunto do Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes.

Sumário

Introdução	7
Extração de DNA do Solo	8
Material e equipamentos necessários para extração de DNA do Solo ...	8
Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)	11
Material e equipamentos necessários para a PCR	12
Visualização da Diversidade Bacteriana do Solo pelo DGGE	16
Material e equipamento necessários para a confecção e corrida do DGGE	17
Etapas do experimento com DGGE	20
Referências Bibliográficas	22
Anexo	23

Avaliação de Diversidade Microbiana em Amostras de Solos

Técnica do PCR/DGGE (Protocolo Laboratorial)

Introdução

A evolução da biologia molecular nas últimas décadas propiciou avanços nos estudos da microbiologia ambiental e da ecologia do solo. A ecologia microbiana molecular é baseada na compreensão das relações entre microrganismos e suas interações com o ambiente, através da análise de moléculas representativas de organismos ou de processos por eles desencadeados. Estas podem ser proteínas, enzimas ou ácidos nucléicos, como RNA (ácido ribonucléico) e DNA (ácido desoxirribonucléico). A extração de DNA de amostras ambientais, com posterior amplificação e análise do material genético, tem sido uma alternativa ou complemento ao clássico método de cultivo e análises fisiológicas de microrganismos (Coutinho et al., 1999; Zilli et al., 2003). Técnicas de análise do DNA podem gerar perfis moleculares ("molecular fingerprinting"), como a eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), que possibilita a análise de várias amostras ambientais simultaneamente, sendo bastante úteis para o monitoramento e compreensão de variações temporais e espaciais de comunidades microbianas (Zilli et al., 2003). Esta tecnologia é a base das pesquisas da Embrapa Solos e do IMPPG/UFRJ, visando o entendimento sobre a estrutura da comunidade microbiana do solo e de suas respostas às mudanças ambientais e, ainda, as conseqüências que as alterações de sua estrutura podem causar no funcionamento do ecossistema. Este trabalho consolida a experiência do Laboratório de Ecologia do Solo que, em parceria com o Laboratório de Ecologia Molecular Microbiana do IMPPG/UFRJ, vem aplicando essa abordagem em diversos projetos de pesquisa. Esforços vêm sendo realizados para harmonizar este protocolo com o adotado por outros laboratórios de Ecologia Molecular do

Solo, no Estado do Rio de Janeiro, e, numa segunda etapa, em nível nacional, visando a possibilidade de integração de resultados e formação de um banco de dados de diversidade microbiana em solos brasileiros. Este texto pode ser lido como um Manual ou Protocolo, para orientar estudantes e pesquisadores em práticas laboratoriais como: 1) extração de DNA do solo; 2) amplificação do material genético com a técnica PCR; 3) processamento das amostras ambientais por meio da DGGE.

Extração de DNA do Solo

A extração de DNA do solo pode ser feita de forma direta ou indireta. Existem no mercado diferentes kits de extração de DNA, mas esta pode ser adaptada às condições do laboratório, usando o mesmo princípio dos kits.

O princípio básico da extração direta de DNA de amostras de solo consiste na suspensão de uma alíquota de solo em uma solução contendo detergentes que enfraquecem as paredes celulares dos microrganismos, e de pérolas de vidro minúsculas, que rompem as células sob forte agitação, liberando no meio seus componentes moleculares. A extração é finalizada com etapas de purificação do DNA liberado na solução.

• Material e equipamentos necessários para a extração de DNA do solo

No Laboratório de Ecologia do Solo da Embrapa Solos utilizamos o protocolo de extração de DNA do Kit FastDNA® SPIN Kit for soils da Bio 101 (Califórnia, EUA), compatível com o equipamento FastPrep®, produzido pela mesma empresa. As soluções e os microtubos utilizados neste kit são fornecidos pelo fabricante. Os demais equipamentos e material são os seguintes:

- Micropipetas;
- ponteiros do tipo "DNase free" esterilizadas;
- tubos de 15 mL com tampa e estéreis;
- estantes para os microtubos e os tubos de 15 mL;
- centrífuga para microtubos;

- aparelho FastPrep®;
- cuba de eletroforese horizontal e fonte de força;
- marcador de DNA 1 Kb a concentração de 1% (V/V);
- transiluminador de UV.

OBS: recomenda-se não reutilizar as ponteiras, microtubos e tubos. Estes últimos, somente após rigorosa lavagem e esterilização.

As etapas de extração de DNA são as que se seguem:

1) Adicionar até 500 mg de solo ao “Lysing Matrix E tube” (um tubo que o fabricante fornece e já vem com pérolas de vidro que, ao ser agitado no aparelho de Fast Prep®, irá fazer a lise física do solo).

Observação: o volume ocupado não deve exceder 7/8 do total, para permitir uma melhor homogeneização.

2) Adicionar 978 μL da solução “Buffer Sodium Phosphate” e 122 μL da solução “MT Buffer” (tampões que manterão o pH próximo de 8,0, preservando o material genético).

3) Colocar os tubos no Fast Prep® e processar por 30 segundos à velocidade de 5,5 m/s.

4) Centrifugar os tubos a 14.000 g por 30 segundos.

5) Transferir o sobrenadante para um tubo limpo (microtubo de 1,5 mL). Adicionar 250 μL do reagente PPS (responsável pela lise química) agitando manualmente (aproximadamente 10x).

6) Centrifugar a 14.000 g por 5 minutos para formar (precipitar) o “pellet”. Transferir o sobrenadante para um tubo limpo de 15 mL.

7) Adicionar 1 mL da suspensão do “Binding Matrix Suspension” ao sobrenadante.

OBS: ressuspender o “Binding Matrix Suspension” antes de usar.

- 8) Agitar manualmente por 2 minutos para permitir a ligação do DNA à matriz. Deixar decantar por 3 minutos na estante para precipitar a matriz de sílica.
- 9) Remover 500 μL do sobrenadante evitando transferir a Binding Matrix. Descartar o sobrenadante.
- 10) Ressuspende a matriz no resíduo de sobrenadante que permaneceu no tubo.
- 11) Transferir aproximadamente 600 μL da mistura para o tubo "Spin Filter" e centrifugar a 14.000 g por 1 minuto. Descartar o conteúdo do "Catch tube" e adicionar o restante do sobrenadante para o "Spin Filter" e centrifugar novamente por 1 minuto.
- 12) Adicionar 500 μL da solução "SEW-M" para o "Spin Filter" e centrifugar a 14.000 g por 1 minuto.
- 13) Remover o filtro e colocar em um "Catch tube" limpo. Deixar secando por 5 minutos à temperatura ambiente.
- 14) Adicionar 50 μL DES e mexer cuidadosamente com uma microponteira, tomando o cuidado para não perfurar o filtro. Centrifugar a 14.000 g por 1 minuto. O produto final da extração (DNA do solo) estará neste tubo.

Posteriormente, o DNA precisará ser analisado quanto à pureza e eficiência das extrações por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 0,8% (vide Anexo). Aplicar em cada "slot" do gel (previamente preenchido com tampão de corrida) 5 μL do produto final da extração mais 5 μL de corante para eletroforese de DNA (que pode ser o fornecido pelo kit ou o corante para eletroforese de DNA – vide Anexo). A quantidade de amostra e corante aplicados no gel – cerca de 7 μL e 5 μL , respectivamente – poderá variar de acordo com o tamanho do "slot". Em um dos "slots" deve-se aplicar cerca de 7 μL do marcador 1 Kb. O tampão de corrida utilizado é o TBE 1X, e a corrida é de, aproximadamente, 2 horas a 70V. Ao final, o gel deve ser corado com brometo (vide Anexo) por 15 a 20 minutos e visualizado sob luz UV em um equipamento transluminador. Se a extração de DNA do solo for bem sucedida, o resultado aparecerá sob a forma de bandas relativamente uniformes, no alto do gel de agarose, alinhados com a primeira banda do marcador, ou acima desta.

O produto final da extração de DNA deve ser preservado a -20°C . Se a banda visualizada no gel for muito intensa, é recomendável que se faça alíquotas de DNA diluídas 5 ou 10 vezes e que estas sejam utilizadas na PCR.

Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

O DNA obtido a partir das amostras de solo é amplificado pela reação de polimerização em cadeia (PCR) (Saiki et al., 1988) usando pares de iniciadores (“primers”) de acordo com a região-alvo a ser amplificada. Para isso são utilizados, por exemplo, iniciadores que reconhecem os flancos da região do gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase (*rpoB*) e a região V3 do DNA ribossômico 16S (reino Eubacteria). Um dos iniciadores de cada par, o 1698f (*rpoB*) e o U968 (16S), apresentam um grampo GC, necessário aos experimentos subsequentes de DGGE (Muyzer & Smalla, 1998). As seqüências dos iniciadores e do grampo GC que utilizamos estão na Tabela 1.

O protocolo e o programa utilizado em nosso laboratório para a reação de PCR foi o utilizado por Peixoto et al., 2002.

Tabela 1. Seqüência dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene *rpoB* e de 16S rDNA e a seqüência do grampo GC.

Iniciadores	Seqüência	Referência
1698f (<i>rpoB</i>)	5'-AACATCGGTTTGATCAAC-3'	Dahllöf <i>et al.</i> , 2000
2041r (<i>rpoB</i>)	5'-CGTTGCATGTTGGTACCCAT-3'	Dahllöf <i>et al.</i> , 2000
U968 (16S rDNA)	5'-GCACGGGGACGCGAAGAACCCTTAC-3'	Muyzer <i>et al.</i> , 1998
L1401 (16S rDNA)	5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3'	Muyzer <i>et al.</i> , 1993
Grampo GC	5'CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCGGGG-3'	Muyzer <i>et al.</i> , 1993

• Material e equipamentos necessários para a PCR

- Micropipetas;
- ponteiras do tipo “DNase free” esterilizadas;
- microtubos de 100 μ L próprios para PCR;
- microtubos de 1,5 mL do tipo “DNase free” esterelizados;
- estante para microtubos de PCR;
- cuba de eletroforese horizontal e fonte de força;
- marcador de DNA 1 Kb a 1 μ L/mL;
- transiluminador de UV.

Os reagentes utilizados são:

- $MgCl_2$ 25 mM ou 50 mM;
- mix de dNTPs (ATP, GTP, CTP e TTP) a 10 mM (ou 2,5 mM de cada);
- tampão da *Taq* Polimerase, livre de magnésio, 10X concentrado;
- iniciadores (“primers”);
- formamida deionizada (vide anexo);
- albumina de soro bovino (BSA);
- enzima *Taq* Polimerase.

O Cloreto de Magnésio e o Tampão geralmente são fornecidos juntos com a enzima *Taq* Polimerase, e as concentrações utilizadas são as especificadas pelo fabricante. A concentração do Cloreto de Magnésio geralmente varia de 25 a 50 μ M, e a composição do Tampão encontra-se na Tabela 1 do Anexo. Em cada microtubo de reação, o volume final será de 50 μ L mas este pode variar, dependendo da finalidade do produto da reação. As concentrações iniciais e finais de cada reagente encontram-se na Tabela 2.

Deve-se observar que, com exceção da água e da formamida, todos os reagentes devem permanecer congelados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O preparo da reação deve ser feito dentro de uma capela própria para PCR e os reagentes devem descongelar do lado de fora,

à temperatura ambiente. Com exceção destes e da formamida, todo o material utilizado (ponteiras, pipetas, água, etc.) deverá ser previamente esterilizado em autoclave por 15 minutos. A água utilizada, tanto nas reações quanto na diluição dos reagentes, deverá ser deionizada (Milli-Q). Deve-se utilizar luvas limpas durante o preparo e a capela deverá ser previamente esterilizada pela exposição de uma lâmpada de ultra-violeta (UV germicida) por, no mínimo, 15 minutos.

Tabela 2. Concentrações dos reagentes para o Mix da PCR. a) *rpoB*; b) 16S rDNA.

a) <i>rpoB</i>			b) 16S rDNA		
Reagentes	Conc. inicial	Conc. final	Reagentes	Conc. inicial	Conc. final
DNTPs mix	10 mM	2,0 mM	DNTPs mix	10 mM	2,5 mM
MgCl ₂	25 mM	2,6 mM	MgCl ₂	25 mM	3,75 mM
Tampão	10 x	1 x	Tampão	10 x	1 x
Iniciador 1	10 µM	0,2 µM	Iniciador 1	10 µM	0,5 µM
Iniciador 2	10 µM	0,2 µM	Iniciador 2	10 µM	0,5 µM
BSA	10 µg/µL	0,4 µg/µL	BSA	10 µg/µL	0,4 µg/µL
Taq Polimerase	0,1 u/ µL		Taq Polimerase	5 u/ µL	0,05 u/ µL

A quantidade de cada reagente para uma reação, portanto, deverá ser calculada de acordo com suas concentrações inicial (estoque) e final (na reação), para um volume final de 50 µL. As quantidades de formamida e DNA são fixas, não necessitando de ajustes de concentração. A quantidade de formamida pode variar de 0,5% a 1,5% do volume final, mas a de DNA é sempre 1 µL (cerca de 100 ng). Uma observação importante é que a formamida e a BSA nem sempre são necessárias aos experimentos de PCR, pois o papel destes reagentes na reação é tão somente aumentar a especificidade da Taq Polimerase pela sequência-alvo do DNA. Isto pode não ser imprescindível, se a qualidade de todos os reagentes for boa e as condições da reação forem adequadas.

Ao final dos cálculos, deve-se completar o volume que falta para os 50 µL com água. Assim, para cada par de iniciadores, temos as quantidades calculadas de cada reagente, conforme a Tabela 3.

Tabela 3. Quantidades dos reagentes para o Mix da PCR. a) *rpoB*; b) 16S rDNA.

a) <i>rpoB</i>		b) 16S rDNA	
Reagentes	1 amostra	Reagentes	1 amostra
Água	18,9 µL	Água	23,0 µL
DNTPs	12,5 µL	DNTPs	10,0 µL
MgCl ₂	2,6 µL	MgCl ₂	7,5 µL
Tampão	5 µL	Tampão	5 µL
Iniciador 1	2,5 µL	Iniciador 1	1,0 µL
Iniciador 2	2,5 µL	Iniciador 2	1,0 µL
Formamida	0,5 µL	Formamida	0,5 µL
BSA (1%)	2 µL	BSA (1%)	0,5 µL
Taq	1 µL	Taq	1 µL

As quantidades de reagentes expostos na Tabela 3 são as necessárias para um tubo de reação; sendo assim, basta multiplicar a quantidade de reagentes pelo número de amostras desejadas mais dois tubos, pois um destes servirá como controle (“branco”) e o outro como sobra de segurança. Os reagentes devem ser misturados e manipulados na capela de PCR, previamente esterilizada, e aliqüotados em tubos de PCR (autoclavados). O último reagente a ser acrescentado é a Taq Polimerase, que deve ser descongelada somente no momento do uso. Ao final, é acrescido o DNA (1 µL) em cada microtubo.

Em seguida, os tubos de reações devem ser colocados no equipamento termociclador seguindo o programa para *rpoB* (figura 1) ou 16S rDNA (figura 2), previamente gravado na máquina, de acordo com a reação realizada.

Ao término da reação de PCR, deve-se verificar o sucesso da amplificação por meio de uma eletroforese em gel de agarose a 1,2% diluída em TBE 1X (vide anexo). A eletroforese com os produtos da PCR deverá seguir o mesmo padrão da eletroforese realizada com os produtos da extração de DNA. Se a PCR for bem sucedida, o resultado aparecerá sob a forma de bandas alinhadas ao tamanho esperado do marcador, ou seja, **433** Kb para as bandas amplificadas com o “primer” do 16S e **343** Kb para as bandas amplificadas com o “primer” do *rpoB*.

	94°C	3 minutos	Etapa de desnaturação da dupla fita de DNA
10 ciclos	94°C	1 minuto	Desnaturação
	40°C	1.5 minuto	Anelamento do DNA com o "primer"
	72°C	2 minutos	Extensão da nova fita de DNA
25 ciclos	94°C	1 minuto	Desnaturação
	50°C	1.5 minuto	Anelamento do DNA com o "primer"
	72°C	2 minutos	Extensão da nova fita de DNA
	72°C	10 minutos	Etapa final de extensão

Fig. 1. Programa de PCR para amplificação do gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, *rpoB*.

	94°C	3 minutos	Etapa de desnaturação da dupla fita de DNA
30 ciclos	94°C	1 minuto	Desnaturação
	55°C	1 minuto	Anelamento do DNA com o "primer"
	72°C	1 minuto	Extensão da nova fita de DNA
		10 minutos	Etapa final de extensão

Fig. 2. Programa de PCR para amplificação do gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase, *rpoB*.

Qualquer outra banda que aparecer além destas significa que houve amplificação de outra(s) seqüência(s) além da esperada. A presença de "rastros" também não é desejável, pois poderá prejudicar a qualidade do resultado do DGGE. Os produtos de PCR devem ser armazenados a cerca de -20 ° C.

Visualização da Diversidade Bacteriana do Solo pelo DGGE

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante possibilita a separação dos produtos de PCR (as fitas de DNA) de acordo com suas seqüências de pares de bases, e não de acordo com os tamanhos dos fragmentos de DNA, como a maioria das técnicas de *fingerprint* genético. Assim, teoricamente, cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria, e a imagem final do gel corresponderá a um padrão de “códigos de barra” referente à comunidade bacteriana dos solos estudados. Os géis da eletroforese são confeccionados com poliacrilamida (acrilamida e bis-acrilamida) e o gradiente desnaturante pode ser químico (agentes desnaturantes como uréia e formamida no DGGE) ou físico (temperatura no TGGE).

Os experimentos com DGGE são realizados com o equipamento “Dcode™ Universal Mutation Detection System” (BIO-Rad, Richmond, EUA). O gradiente do gel desnaturante pode ser ajustado de acordo com o fragmento de DNA amplificado por PCR. O exemplo que daremos aqui é de um gel de poliacrilamida com um gradiente linear de desnaturantes de 40% a 70%, formados a partir de soluções-estoque de poliacrilamida (6%), uma com 0% e outra contendo 100% dos agentes desnaturantes (100% corresponde a 7M de uréia e 40% de formamida deionizada), conforme os cálculos em anexo.

Após a confecção os géis devem polimerizar por, no mínimo, 3 horas. Em seguida, devem ser acoplados ao aparelho de DGGE, que comporta, no máximo, dois géis por corrida.

Em cada “slot” do gel deverá ser aplicada uma alíquota de cerca de 20 µl de produto de PCR misturada a 20 µl de corante para eletroforese de DNA. A aplicação das amostras no gel deverá ocorrer com os “slots” previamente preenchidos com tampão TAE 0,5X (Tabela 1 do Anexo) e ser extremamente cuidadosa para que não ocorra contaminação de amostras de um “slot” para outro. A quantidade de produto de PCR aplicada no gel poderá variar de acordo com a qualidade do produto e a sensibilidade do método de coloração do gel.

A eletroforese é desenvolvida com 70V a 60°C por 18 horas. Após a corrida, o gel é retirado da placa e pode ser corado com brometo de etídeo, nitrato de prata, ou Sybr Green® (Molecular Probes, Oregon, EUA), entre outros.

• Material e equipamento necessários para a confecção e corrida do DGGE

- Micropipetas;
- ponteiras do tipo “DNase free” esterilizadas;
- Erlenmeyer de 25 mL;
- pipetas de 10 mL;
- gaze;
- álcool.

As soluções necessárias para a confecção e corrida do DGGE encontram-se no Anexo.

• Etapas do experimento com DGGE**a) Montagem das placas**

Duas placas de vidro são utilizadas na montagem de um gel (uma maior e outra menor). É recomendável que as placas sejam previamente limpas com gaze e álcool, e que não se utilize detergente na sua lavagem (somente água e esponja macia). Entre as placas são colocados os espaçadores (figura 3). As placas são encaixadas num suporte e presas por grampos, que devem ser ajustados para formar uma certa pressão. É utilizado um molde do gel em cartão para que seja verificada a pressão ideal entre as duas placas (figura 4). Esta é atingida quando é possível puxar o cartão entre as duas placas, mas com uma certa resistência.

Uma vez montado o “sanduíche” com as placas, ele deve ser colocado no suporte para, então, ser feita a confecção do gel (figura 4). Entretanto, antes de ser feito o gel, deve-se aplicar uma solução vedante (vide anexo) para evitar vazamentos no momento da confecção do gel. A solução vedante deve escorrer entre as bordas das placas, rente aos espaçadores, e se acumular na base.

Observe que qualquer solução que contenha TEMED e persulfato de amônio deve ser utilizada imediatamente após o seu preparo, pois estes reagentes são os responsáveis pela polimerização da acrilamida e bis-acrilamida.

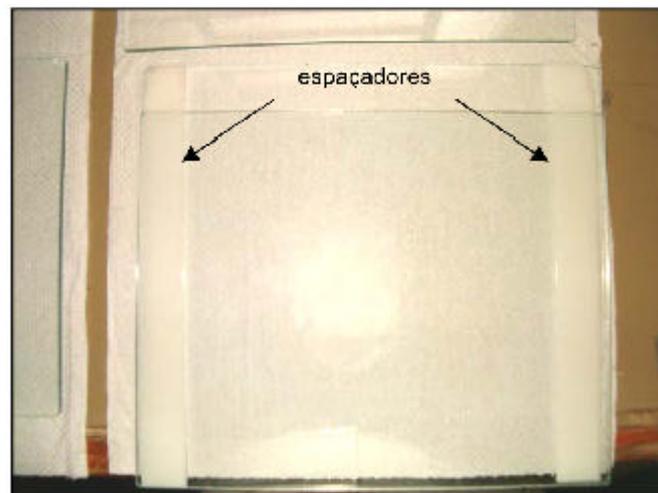


Fig. 3. Visualização das placas com os espaçadores.

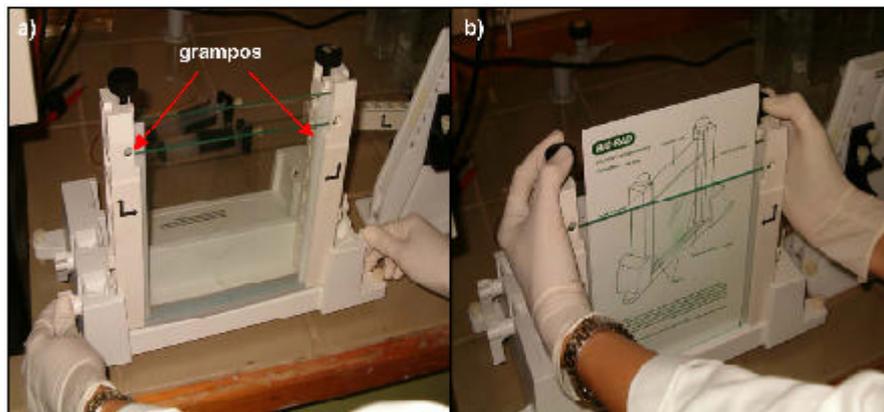


Fig. 4. Visualização do "sanduíche" com as placas de vidro. a) Montagem das placas e grampos e encaixe no suporte; b) ajuste da pressão com o molde em cartão.

b) Confecção do gel

Cada uma das soluções que constituirá o gel é colocada em uma das seringas. Deve-se preparar cada solução num Erlenmeyer de 25 mL e sugá-la com a mangueira para dentro da seringa, de modo que não se formem bolhas. As seringas são, então, acopladas ao aparelho que formará o gradiente desnaturante ao longo do gel. O

movimento do aparelho para se formar o gradiente deve ser contínuo (figura 5). Ao final, a coloração do gel deve apresentar um gradiente de cor azul mais claro a mais escuro, correspondente ao gradiente desnaturante de uréia e formamida (figura 6). Deve-se lavar as seringas imediatamente com água destilada após o uso, para evitar que ocorra polimerização do restante das soluções na mangueira.

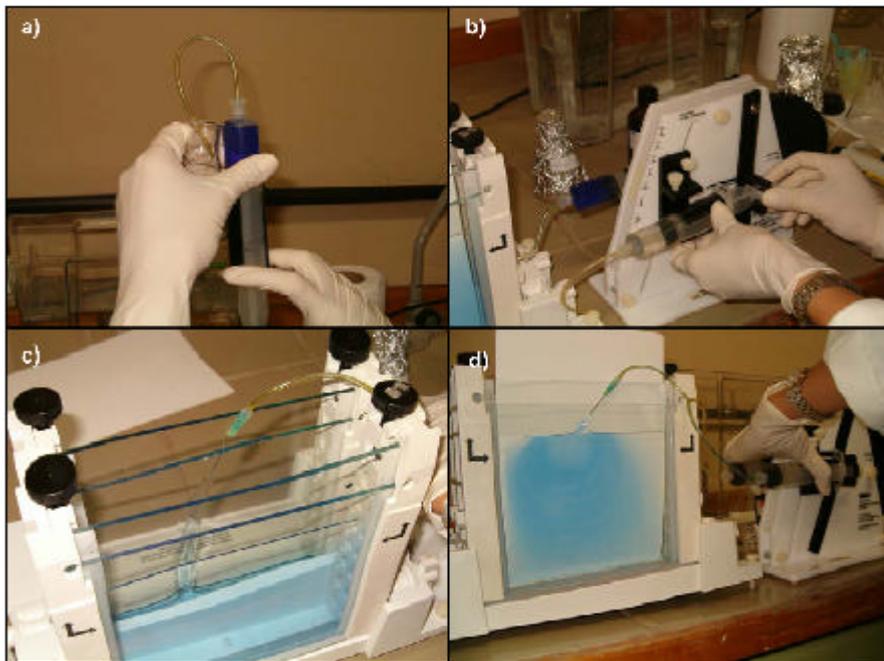


Fig. 5. a) Preenchimento da seringa com a solução 70% desnaturante; b) encaixe das seringas no aparelho que formará o gradiente; c) e d) formação do gradiente desnaturante.

c) Preparo da solução que constituirá os " slots"

Por último, deve ser feita a solução que completa o gel, onde o pente é acoplado. Após a polimerização da solução, o pente é retirado e estarão formados os "slots".

d) Montagem do sistema *Dcode*

As placas e os grampos contendo os géis são acoplados no sistema que fecha a corrente para se dar o processo de eletroforese (figura 7). Este conjunto deve ser colocado dentro da cuba de eletroforese com tampo a 60°C. Se os grampos

estiverem muito apertados, deve-se afrouxá-los levemente antes da montagem do sistema, por conta da dilatação que ocorrerá devido à temperatura do tampão.



Fig. 6. Visualização do gel com gradiente desnaturante.

A aplicação das amostras pode ser feita dentro da cuba ou fora desta, desde que os "slots" estejam preenchidos com tampão. Colocar a tampa da cuba, encaixar os fios e aplicar a corrente. É recomendável que se ligue todo o sistema num equipamento "no-break" durante a corrida.

Ao término da corrida, deve-se desmontar o sistema *Dcode* e retirar os géis. A retirada dos géis deve ser feita cuidadosamente, de preferência dentro de uma bandeja e "lavando-os" com tampão para que desgrudem das placas e, assim, evitar que rasguem.

Para a visualização dos géis em transiluminador de UV, a coloração poderá ser feita com brometo de etídeo (como no gel de agarose) por cerca de 15 minutos, ou Sybr Green® (vide Anexo) por pelo menos 30 minutos.



Fig. 7. Montagem do sistema *Dcode*. a) e b) Encaixe do gel no suporte; c) ajuste do sistema dentro da cuba.

Caso se queira preservar o gel para análises posteriores, como o registro da imagem por *scanner* ou excisão de bandas, o método de coloração por nitrato de prata, como descrito a seguir, é o mais adequado.

Coloração do gel de poliacrilamida com nitrato de prata (a composição das soluções encontra-se no Anexo).

- 1) Agitar o gel por 30 minutos em solução fixadora;
- 2) lavar rapidamente o gel com H₂O destilada;
- 3) agitar o gel por 30 minutos em solução de nitrato de prata;
- 4) despejar a solução reveladora;
- 5) quando o gel estiver bem próximo da coloração desejada, despejar a solução de parada;
- 6) lavar o gel em água destilada e guardar em solução de estoque na geladeira. O gel também pode ser guardado entre duas folhas de papel celofane, depois de passar pela solução de estoque.

Observe que, durante o processo de coloração por nitrato de prata, o gel fica o tempo todo dentro da bandeja e são as soluções que são adicionadas e removidas da bandeja. Isto deve ser feito com auxílio de uma mangueira associada a uma bomba de vácuo, e esta a um frasco Kitassato, fechado com rolha.

Referências Bibliográficas

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P., ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.3, n.71, p.491-503,1999.

DAHLLÖF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG; S. *rpoB*-Based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, 3376-3380, 2000.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN; A.G.. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, 695-700, 1993.

MUYZER; G., SMALLA; K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Mini review. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, 73, 127-141, 1998.

PEIXOTO, R. S.; COUTINHO, H. L. C.; RUMJANEK, N. G.; MACRAE, A.; ROSADO, A. S. Use *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. **Letters in Applied Microbiology**, London, v. 35, p. 316-320, 2002.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

Anexo

Tabela 1. Soluções e Tampões.

Nome do tampão e concentração final	Reagentes	Concentração dos reagentes
TAE 1X (Tris-acetato)	Tris-acetato, pH 7,4	20 mM
	Acetato de sódio	10 mM
	EDTA	0,5 mM
TBE 1X (Tris-borato)	Tris	89 mM
	EDTA	2,5 mM
	H ₂ BO ₃	89 mM
Tampão da Taq Polimerase, livre de magnésio, 10X	Tris-HCl	100 mM
	KCl	500 mM
	Triton® X-100 (Promega, California, USA)	0,1%

• **Solução EDTA 0,5 M, pH 8,0**

EDTA	18,60 g
NaOH em lentilhas (para ajuste do pH)	
Volume total da solução	100mL

Adicionar cerca de 70 mL de água em 18,6 g de EDTA. Colocar sob agitação em placa e adicionar, aos poucos, as lentilhas de NaOH para ajustar o pH a 8,0. O EDTA só será solubilizado quando o pH estiver próximo a 8,0. A adição de NaOH já promove liberação de calor (reação exotérmica), não necessitando de aquecimento adicional. Completar o volume para 100 mL. E estocar a temperatura ambiente.

• **Solução tampão TAE 50X.**

Tris Base	60,50 g
Ácido acético glacial	14,28 mL

Solução EDTA 0,5 M, pH 8,0	25 mL
Volume total da solução	250 mL

Pesar 60,5 g de Tris Base e adicionar 150 mL de água Milli-Q. Colocar para agitar em placa com um agitador magnético e adicionar 14,28 mL de ácido acético glacial e 25 mL de solução de EDTA. Após solubilização, completar o volume com água deionizada para 250 mL. O pH final da solução é 9,0. Autoclavar esta solução por 20 minutos e estocar em geladeira.

• **Solução tampão TBE 10X**

Tris Base	108,0 g
Ácido bórico	55,0 g
EDTA (0,5M)	40 mL

Pesar 108,0 g de Tris Base e adicionar 500 mL de água deionizada. Colocar para agitar em placa com um agitador magnético e adicionar 55 g de ácido bórico e 25 mL de solução de EDTA. Após solubilização, completar o volume com água Milli-Q para 1000 mL.

Autoclavar esta solução por 15 minutos e estocar em geladeira.

• **Solução para confecção de gel de agarose para corrida de eletroforese horizontal**

Agarose (grau analítico ou molecular)	0,8 g (para gel a 0,8%)
Agarose (grau analítico ou molecular)	1,2 g (para gel a 1,2%)
Tampão TBE 1X para completar o volume final de 100 mL	

Misturar a agarose (0,8 g ou 1,2 g) em TBE 1X e aquecer em placa aquecedora ou microondas, até que a agarose esteja totalmente dissolvida. Confeccionar o gel com esta solução. O restante pode ser armazenado em geladeira e aquecido posteriormente para nova utilização.

• Corante para eletroforese de DNA

Azul de bromofenol	0,005 g
Xilenocianol	0,005 g
Glicerol 100%	7 mL
Água deionizada	3 mL

Dissolver o azul de bromofenol e o xilenocianol em água e adicionar o glicerol.

Deixar solubilizar e estocar em temperatura ambiente.

• Solução de Brometo de Etídeo para visualização de DNA em Transiluminador de UV

Brometo de etídeo (10 mg/mL)	50 µL
Tampão TBE 1X	1.000 mL

Diluir o brometo de etídeo no TBE. Essa solução deve ser preparada e armazenada à temperatura ambiente, preferencialmente na ausência de luz, ou em frasco âmbar.

Obs.: o brometo de etídeo é um reagente muito perigoso, devido ao seu potencial mutagênico. Portanto, deve se tomar muito cuidado ao manipulá-lo, sempre utilizando jaleco de manga comprida e luvas apropriadas.

• Solução de Syber Green® para visualização de DNA em transiluminador de UV

Diluir o Syber Green® em água deionizada na proporção de 1:10.000. Esta solução deve ser preparada somente no dia do uso, na ausência de luz ou em frasco âmbar.

• Formamida Deionizada

Formamida P.A.	100 mL
Resina deionizante	5 g

Adicionar 5 g da resina deionizante em 100 mL de formamida P.A. e colocar sob agitação em placa por aproximadamente 1 hora. Filtrar em papel de filtro (qualitativo, número 4) ou, na falta deste, em filtro de papel para café. Estocar à temperatura ambiente.

• **Solução de acrilamida 40%**

Acrilamida	38,93 g
Bis-acrilamida	1,07 g
Volume final da solução	100 mL

Dissolver 38,93 g de acrilamida em 30 mL de água deionizada. Pesar 1,07 g de Bis-acrilamida e adicionar aos poucos, sob agitação, a acrilamida já dissolvida. Após dissolver a acrilamida e a bis-acrilamida em água, o volume da solução quase duplica, necessitando apenas de um pequeno ajuste com água deionizada para 100 mL. Filtrar em membrana tipo Millipore® de 0,45 µm e estocar em geladeira (a filtração não é estritamente necessária, mas desejável).

Obs 1.: deve-se tomar muito cuidado ao manipular a acrilamida e a bis-acrilamida e todas as soluções que contenham estes reagentes em sua composição. Estas substâncias são potencialmente mutagênicas se inaladas ou absorvidas pela pele. Usar material de proteção adequado (jaleco de manga comprida, luvas, máscara e óculos).

Obs 2.: todas as soluções que contiverem acrilamida e bis-acrilamida em sua composição devem ser preparadas e armazenadas na ausência de luz (utilizar frascos âmbar).

• **Solução 0% desnaturante (para confecção do gel a 6% de acrilamida)**

Solução de acrilamida a 40%	15 mL
Solução tampão TAE 50X	2 mL
Volume final da solução	100 mL

Misturar 15 mL de acrilamida 40% com 2 mL de solução tampão TAE 50X e completar o volume para 100 mL utilizando água deionizada. Filtrar em membrana tipo Millipore® de 0,45 µm e estocar em geladeira na ausência de luz por aproximadamente 1 mês (a filtração não é estritamente necessária, mas desejável).

• Solução 100% desnaturante (gel 6% de acrilamida)

Uréia P.A.	42 g
Formamida deionizada	40 mL
Solução de acrilamida a 40%	15 mL
Solução tampão TAE 50X	2 mL
Volume final da solução	100 mL

Adicionar a formamida deionizada à uréia, seguida da solução tampão TAE e a solução de acrilamida 40%. Colocar sob agitação em placa magnética até que toda a uréia esteja dissolvida (pode levar cerca de 40 minutos). Completar o volume para 100 mL. Filtrar em membrana Millipore de 0,45 µm e estocar em geladeira na ausência de luz (utilizar frasco âmbar) por aproximadamente 1 mês.

Obs 1.: quando a uréia estiver dissolvida, o volume inicial da solução terá praticamente duplicado, sendo necessário somente um pequeno ajuste no volume final da solução.

Obs 2.: após um certo tempo de armazenagem na geladeira, podem se formar cristais de uréia. Neste caso, deve-se agitar a solução em placa e, se necessário, aquecer em banho-maria.

• Solução de Persulfato de Amônio 10% (APS)

Persulfato de Amônio	0,1 g
Água deionizada	1 mL

Dissolver em um microtubo de 1,5 mL 0,1 g de persulfato de amônio em 1 mL de água deionizada. Esta solução pode ser preparada no momento do uso ou em maior quantidade (multiplicar os valores por 10) para armazenamento a -20 °C em alíquotas de 1mL.

• Solução para vedar as placas

Solução 0% desnaturante	2 mL
TEMED	4 µL
APS 10%	10 µL

Cálculos para o preparo das soluções para o gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (gradiente 40% - 70%)

- **Solução 40% desnaturante** (volume final de 12 mL, para confecção de um gel)

Usando a fórmula:

$$C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f \quad (1)$$

onde C_i é o valor da concentração inicial da solução 100% desnaturante, V_i é o volume inicial desta concentração, C_f é a concentração final da solução (neste caso, 40% desnaturante) e V_f é o volume final da solução, temos:

$$100 \cdot V_i = 40 \cdot 12 \quad (2)$$

Logo, temos que o valor de V_i é igual a 4,8 mL. Para completar o volume da solução para 12 mL, adicionar 7,2 mL da solução 0% desnaturante.

- **Solução 70% desnaturante** (volume final de 12 mL, para confecção de um gel)

Aqui, basta substituir o valor de C_i na equação (1) por 70. Assim, teremos:

$$100 \cdot V_i = 70 \cdot 12 \quad (3)$$

O valor de V_i , portanto, será 8,4 mL. Para completar o volume de 12 mL, adicionar 3,6 mL da solução 0%.

Obs.: somente nesta solução deve-se adicionar 100 μ L do corante *Dcode Dye Solution*.

Note que estes cálculos são válidos para a confecção de um gel com gradiente desnaturante de 40% a 70%. Estes valores poderão ser ajustados na fórmula (1) para a confecção de géis com qualquer faixa de valores de desnaturação.

Após o preparo de cada solução, deve-se adicionar 4,2 μ L de APS 10% e 0,83 μ L de TEMED para cada mL de solução. Assim, cada solução de 12 mL levará 50 μ L de APS 10% e 10 μ L de TEMED. Estes reagentes são os responsáveis pela polimerização da acrilamida e da bis-acrilamida. Portanto, ao adicioná-los às soluções 40% e 70%, estas devem ser utilizadas imediatamente para que não ocorra a polimerização nos frascos Erlenmeyer ou nas seringas.

• Corante *Dcode Dye Solution*

Azul de bromofenol	0,05 g
Xilenocianol	0,05 g
Solução tampão TAE 1X	10 mL

Solubilizar o azul de bromofenol e o xilenocianol em TAE 1X. Armazenar em temperatura ambiente.

• Solução “stacking” (para formação dos “slots”) para 2 géis

Solução 0% desnaturante	4 mL
TEMED	8 µL
APS 10%	20 µL

Misturar todos os reagentes e aplicar 2 mL na parte de cima de cada gel. Encaixar o pente imediatamente e removê-lo cuidadosamente somente após a polimerização.

• Soluções para coloração do gel de poliacrilamida com Nitrato de Prata**Solução Fixadora**

Etanol P.A.	100 mL
Ácido acético glacial	5 mL

Misturar o etanol e o ácido acético e completar com água destilada para o volume final da solução de 1.000 mL. Esta solução deve ser preparada em capela com sistema de exaustão. Armazenar em geladeira.

Solução de Nitrato de Prata

Nitrato de Prata (AgNO ₃)	0,48 g
Água destilada	300 mL

Diluir o nitrato de prata na água destilada em uma placa magnética. Esta solução deve ser preparada somente no dia do uso, no escuro ou em frasco âmbar, e utilizada somente quando o nitrato de prata estiver totalmente diluído.

Solução Reveladora

Solução de Hidróxido de Sódio 7,5M*	30 mL
Formaldeído P.A.	2,25 mL

Misturar a solução de hidróxido de sódio e o formaldeído e completar com água destilada para o volume final da solução de 300 mL. Esta solução deve ser preparada somente no dia do uso e em capela com sistema de exaustão.

(*) Solução de Hidróxido de Sódio 7,5M: dissolver 30 g de NaOH em lentilhas e completar com água destilada para o volume final da solução de 100 mL. Armazenar em temperatura ambiente. Cuidado ao manipular esta solução, pois ela é muito corrosiva.

Solução "Stop"

Ácido acético glacial	15 mL
-----------------------	-------

Dissolver o ácido acético glacial em água destilada até o volume final da solução de 50 mL. Esta solução deve ser preparada em capela com sistema de exaustão. Armazenar à temperatura ambiente.

Solução de armazenamento do gel

Ácido acético glacial	50 mL
Etanol P.A.	100 mL
Glicerol P.A.	10 mL

Misturar o ácido acético, o etanol e o glicerol e completar com água destilada para o volume final da solução de 1.000 mL. Esta solução deve ser preparada em capela com sistema de exaustão e armazenada em geladeira.