

Adaptação da metodologia de PCR semiquantitativo e marcadores SSRs para diferenciação de amostras quanto ao número de cópias de um alelo

Francielle Alline Martins¹, Claudia Teixeira Guimarães², Pedro Crescêncio Souza Carneiro³, José Eustáquio de Souza Carneiro⁴ e Cosme Damião Cruz⁵

Introdução

Dentre as metodologias mais recentes desenvolvidas a partir da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para a quantificação de doses diferenciadas de um alelo, destaca-se a chamada PCR em tempo real ou PCR quantitativo, pela qual pode-se determinar a quantidade de moléculas amplificadas. Apesar de sensível e confiável, esta metodologia ainda é cara, requerendo equipamentos específicos o que limita o seu uso rotineiro em vários laboratórios [1]. Assim, faz-se necessária a adaptação de metodologias mais simples e menos onerosas para análises de quantificação. Nesse sentido, a metodologia de PCR semiquantitativo (PCR-SQ) vem sendo adaptada, com sucesso. Embora não permita uma quantificação absoluta, espera-se ser possível inferir quanto ao número de moléculas amplificadas em cada genoma se o produto de PCR corresponder à fase exponencial, onde o número de cópias é função da quantidade inicial [2].

A falta de informatividade dos indivíduos heterozigotos é uma das dificuldades do mapeamento de QTLs em populações exogâmicas [3], uma vez que não é possível identificar a origem de cada um dos seus alelos, implicando na exclusão desses indivíduos na análise do contraste entre médias. Com isso, tais indivíduos não contribuem para a detecção do QTL. Uma possível forma de incluí-los nas análises seria por meio da genotipagem do seu endosperma, onde se espera que um indivíduo heterozigoto M_1M_2 apresente um endosperma $M_1M_1M_2$ ou $M_1M_2M_2$, quando o genitor feminino é o doador do alelo M_1 ou M_2 , respectivamente.

Devido ao potencial uso do PCR-SQ para inferir o número de moléculas amplificadas, o objetivo deste estudo foi adaptar esta metodologia para a determinação do número de cópias dos alelos em mistura de DNA que simulam as condições observadas no tecido endospermático.

Material e métodos

A. Material vegetal e extração de DNA

Foram utilizadas folhas de duas linhagens endogâmicas de milho, L3 e L1113-01. O DNA destas linhagens foi extraído segundo o método descrito por Saghai-Marooof *et al.* [4]. Neste estudo foram utilizados os DNAs das linhagens individuais bem como de suas misturas em diferentes proporções. Mistura 1:1 (15ng do DNA L3 e 15ng do DNA L1113-01), Mistura 1:2 (10ng do DNA L3 e 20ng do DNA L1113-01) e Mistura 2:1 (20ng do DNA L3 e 10ng do DNA L1113-01). As misturas 1:2 e 2:1 representam constituições genótípicas de endosperma de híbridos dessas linhagens, em que a L3 foi utilizada como genitor masculino e feminino, respectivamente.

B. Otimização da técnica de PCR-SQ em agarose

Três primers SSRs (*umc1653*, *bnlg1006* e *bnlg182*), polimórficos entre as linhagens parentais, foram selecionados baseando-se no estudo de informatividade e padrão de amplificação realizado por Padilha [5] para as reações de amplificação que foram realizadas em um volume final de 10 μ L contendo 30 ng de DNA, Tris-HCl 1 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, 125 μ M de cada um dos dNTPs, 0,6 μ M de cada um dos primers e 1 U da enzima Taq polimerase. Os ciclos da reação de PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, nove ciclos de 94°C por 20 s, 68°C por 20 s com a redução de 1°C a cada ciclo e 72°C por 20 s, seguidos de 15 a 25 ciclos de amplificação a 94°C por 20 s, 60°C por 20 s e 72°C por 20 s, para o estudo da cinética de amplificação.

Os fragmentos amplificados foram observados em géis de agarose 3% sob eletroforese a 80 V, por duas horas. O gel foi tratado com brometo de etídeo (1 mg/mL) e a imagem capturada pelo Eagle-Eye II, sob luz ultra-violeta. As imagens foram analisadas pelo programa ImageQuANT® (Molecular Dynamics), para quantificação das intensidades das bandas.

1. Estudante de Pós-graduação, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, sala 319, Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: franufv@hotmail.com

2. Pesquisadora da Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, CEP 35701-970. E-mail: claudia@cnpm.embrapa.br

3. Professor Adjunto do Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, sala 319, Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: carneir@ufv.br

4. Professor Adjunto do Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP 36570-000.

5. Professor Titular do Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, CEP 36570-000. E-mail: cdcruz@ufv.br

Apoio financeiro: EMBRAPA e CNPq.

Resultados

Os produtos da reação de PCR foram observados a partir de 28 ciclos de amplificação. As bandas correspondentes aos fragmentos de menor tamanho se apresentaram mais difusas em comparação com as bandas dos fragmentos maiores, dificultando a análise da intensidade relativa entre as bandas das diferentes misturas (Figura 1).

Após a análise da intensidade das bandas pelo programa ImageQuaNT®, os valores correspondentes a cada leitura foram plotados em gráficos, apresentados na Figura 2, nos quais pode-se observar que a reação de amplificação com 30 ciclos foi a que melhor representou a fase exponencial, tanto para o DNA genômico individual quanto nas diferentes misturas, utilizando o primer SSR *bnlg182*. Para os demais primers estudados, embora não tenha sido possível a observação gráfica da proporção 2:1 (L3 como genitor feminino), em nenhum momento da curva, considerou-se também o número de ciclos ideal igual a 30. Entre os pontos analisados, este se apresentou ligeiramente anterior ao início da fase de saturação, correspondendo ainda à fase exponencial, onde o número de amplificações é função da quantidade inicial de cada alelo.

O estudo da cinética da reação de amplificação do primer *bnlg182* mostrou que, nas misturas de DNA, a amplificação do fragmento de maior tamanho atinge a fase de saturação com um menor número de ciclos e a intensidade do alelo de menor tamanho foi superior, exceto em alguns ciclos onde a proporção do DNA original foi a metade. Tal perfil de amplificação indica que o alelo de menor tamanho foi preferencialmente amplificado na reação de PCR.

Pôde-se observar ainda que quanto menor for a diferença de tamanho entre os alelos polimórficos, menor é a diferença de intensidade entre as bandas quando o DNA das linhagens é misturado e que o número de ciclos de amplificação para atingir a fase de saturação tende a ser mais semelhante.

Discussão

Neste estudo, preocupou-se com a padronização da metodologia com o intuito de diferenciar a quantidade de DNA parental nas misturas em diferentes proporções. Dessa forma, a determinação da intensidade dos fragmentos amplificados a partir do DNA parental e de suas misturas em diferentes proporções foi o ponto crítico para a determinação das variações quanto ao número de cópias de um loco no genoma por meio da técnica de PCR-SQ. Para tal, foram padronizadas e mantidas constantes as condições eletroforéticas (tempo e voltagem), concentração de agarose, da solução-tampão e da solução de brometo de etídio. Os parâmetros para captura e análise das imagens dos géis foram padronizados para minimizar

qualquer efeito que não fosse ao acaso. Condições semelhantes também foram utilizadas por Marin *et al.* [1].

As diferenças quanto a intensidade das bandas no mesmo gel foram atribuídas ao número de produtos amplificados. Para o primer *bnlg1006* houve uma amplificação preferencial do alelo presente na linhagem L1113-01 (224 pb). Independente das diferentes concentrações iniciais, o alelo de maior tamanho apresentou maior intensidade em todas as amostras avaliadas, indicando maior quantidade de moléculas amplificadas. Por outro lado, para os locos *bnlg182* e *umc1653* apresentaram uma ligeira preferência pela amplificação do alelo de menor tamanho.

Observou-se que a cinética da reação foi específica para cada primer e em especial para cada alelo. Deve-se ressaltar ainda que, a diferença de tamanho entre os alelos polimórficos interfere diretamente na cinética da reação, de forma que os primers que apresentaram menores diferenças de tamanho entre os alelos amplificados são mais adequados para estudos de PCR-SQ, onde se pretende diferenciar as doses dos alelos.

O gel de agarose na concentração de 3,0% não apresentou resolução suficiente para avaliar diferença menor que 20 pb, e ainda, a observação de bandas difusas foi constante, dificultando a delimitação da região para a quantificação precisa da sua intensidade, sobretudo nos fragmentos de menor tamanho. Ferreira & Grattapaglia [6] recomendam o uso de matriz de alta resolução para a visualização desses fragmentos, como géis de poliácridamida corados com brometo de etídio ou prata.

Agradecimentos

Ao Centro Nacional de Pesquisa em Milho e Sorgo da EMBRAPA, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Referências

- [1] MARIN, L. J.; CUNHA, A. A.; AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. 2002. Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene *gb* de citomegalovírus. Medicina, Ribeirão Preto, n. 35, p. 85-94.
- [2] GÉNÉTHON 2001 [Online]. La PCR quantitative en temps reels ou la "Taqman". Homepage: <http://www.genethon.fr>
- [3] LIU, B. H. 1998. Statistical genomics. New York: CRC, 610 p.
- [4] SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc Natl Acad Sci., USA, n. 81, p. 8014-8018.
- [5] PADILHA, L. 2002. Marcadores moleculares semi-automatizados na caracterização e determinação da diversidade genética entre linhagens de milho tropical. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Agronomia-Fitotecnia, UFPA, Lavras, 85 p.
- [6] FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 220 p.



Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 3% tratado com brometo de etídio, dos produtos amplificados com o *primer* SSR *bnlg182* das amostras de DNA foliar e das respectivas misturas. Fig. 1A: Produtos da reação com amostras de DNA das linhagens L3, L1113-01 e da Mistura 1:1. Fig. 1B: Produtos da reação com as Misturas (1:2) e (2:1). O número de ciclos de amplificação variou de 24 a 34, com intervalo de dois ciclos.

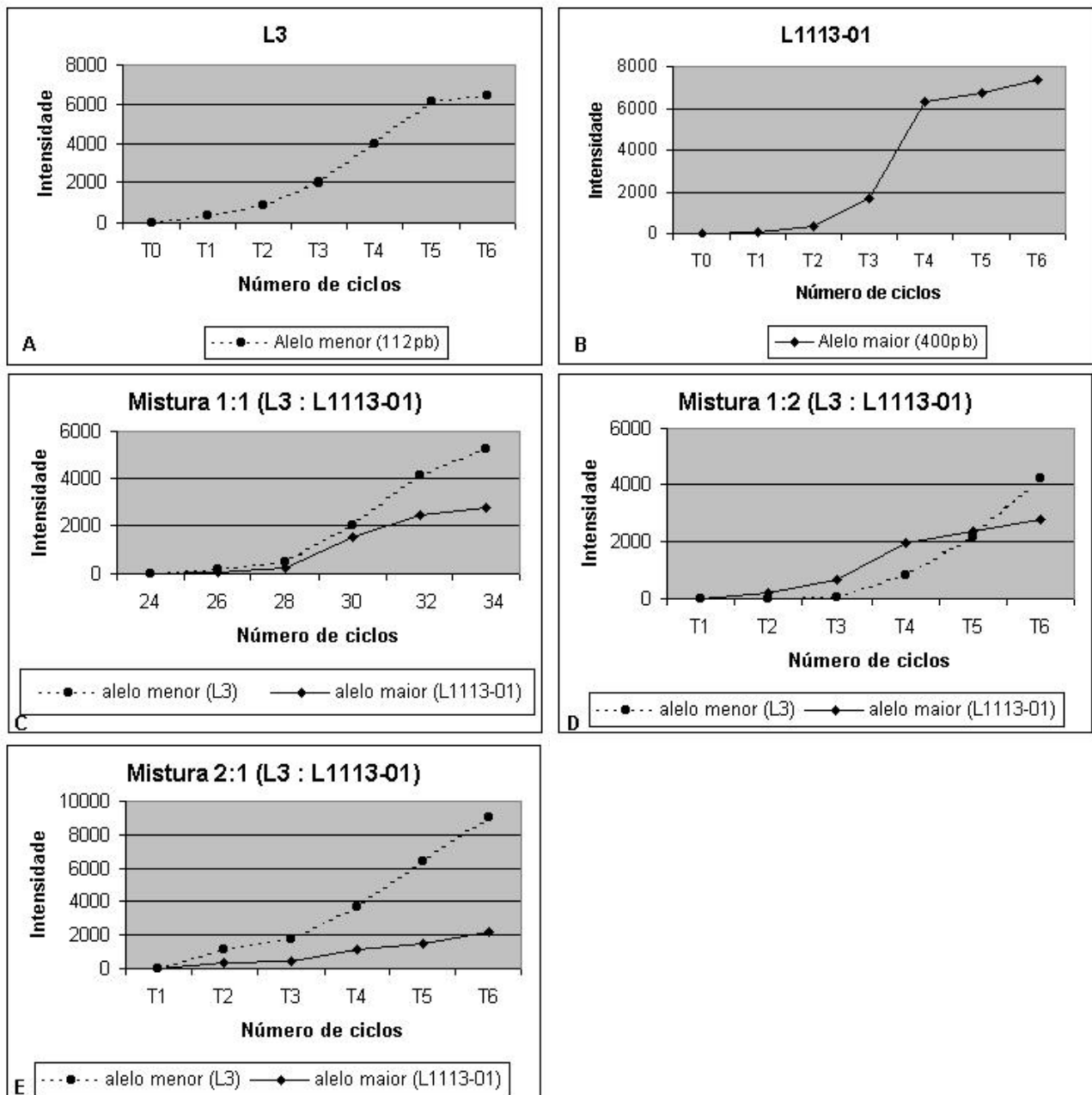


Figura 2: Cinética da reação de amplificação pelo *primer* *bnlg182*, que variou entre 24 e 34 ciclos. Fig. 2A: Produtos das reações de amplificação do DNA da linhagem L3. Fig. 2B: Produtos das reações de amplificação do DNA da linhagem L1113-01. Fig. 2C: Produtos da reação de amplificação da Mistura 1:1 (15 ng do DNA L3 e 15 ng do DNA L1113-01). Fig. 2D: Produtos da reação de amplificação da Mistura 1:2 (10 ng do DNA L3 e 20 ng do DNA L1113-01). Fig. 2E: Produtos da reação de amplificação da Mistura 2:1 (20 ng de DNA L3 e 10 ng de DNA L1113-01).