

ANÁLISE DE DOIS MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE DNA EM AMOSTRAS DE DIFERENTES POPULAÇÕES DE AÇAIZEIRO

Emanuelly Melo de Oliveira¹; Maria do Socorro Padilha de Oliveira² e Silvaney Fonseca Ferreira³.

RESUMO

Em reações PCR faz-se necessário trabalhar com DNA de boa qualidade. E conhecer a eficiência de cada processo na análise de DNA, tais como a extração e a quantificação do DNA. A quantificação envolve a estimativa da concentração do DNA obtida, que depende do tipo e quantidade de amostra disponível. Dentre os métodos disponíveis para quantificação tem-se a eletroforese em gel de agarose, que permite a resolução de ácidos nucléicos, um método comparativo, e a utilização do fluorímetro, um equipamento que trabalha com alterações nas características de fluorescência na presença de DNA, um método quantitativo. O objetivo deste trabalho foi analisar esses dois métodos na quantificação de amostras de DNA de açaizeiro verificando a eficácia e a praticidade. Foram extraídos DNA's de folíolos de 87 matrizes de açaizeiro de três populações. A concentração do DNA genômico foi estimada de duas formas: em gel de agarose a 1,0% utilizando a comparação do DNA total com três concentrações do DNA lambda (50, 100 e 200 ng/ μ L) e em fluorímetro, marca Hoefer DyNA Quant 200, por meio da média de duas ou três leituras, conforme a variação de 10% para mais ou para menos da amostra quantificada. O método mais eficaz foi escolhido através de estatística simples, envolvendo média, valores mínimos e máximos e coeficiente de variação para cada população e para amostra total. A quantificação na agarose detectou 87,76; 64,4 e 61,03 ng para as populações de Breves, São Sebastião da Boa Vista e BRS- Pa. A variação ficou entre 0 e 200ng. No fluorímetro as quantificações foram 82,06; 82,24 e 49,85 ng para as populações de Breves, São Sebastião da Boa Vista e BRS-Pa. Ficando a variação entre 8 e 335,5ng. A análise desses métodos mostra que os dois métodos são considerados eficientes, sendo a agarose o método mais prático.

PALAVRAS-CHAVE: Quantificação de DNA, Agarose e fluorímetro.

SUMMARY

In PCR reactions it is necessary to work with DNA of good quality. And to know the effectiveness of each process in the analysis of DNA, such as DNA extraction and quantification. The quantification involves the estimation of the concentration of DNA obtained, which depends on the type and amount of sample available. Among the methods available for quantification has been in the gel electrophoresis of agarose, which allows the resolution of acid nucléicos, a comparative method, and use of fluorímetro, an equipment that works with changes in the characteristics of fluorescence in the presence of DNA, a method quantitatively. The purpose of this study was examining these two methods for the quantification of DNA samples from açaizeiro verifying the effectiveness and practicality. 's DNA was extracted from foliage of 87 dies of açaizeiro of three people. The concentration of DNA genômico was estimated in two ways: in gel of agarose to 1.0% using the comparison of DNA total with three concentrations of DNA lambda (50, 100 and 200 ng / μ L) and fluorímetro, brand Hoefer DyNA Quant 200, by means of the average of two or three readings, as a variation of 10%, plus or minus the sample quantified. The most effective

1. Aluna do curso de agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia e Estagiária do laboratório de genética/Embrapa, Belém, PA, CEP 66095-100. E-mail: emmanuellymelo@ufrpa.br

2. Pesquisadora A do Laboratório de genética, Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, CEP 66095-100. E-mail: agueline@cpqar.embrapa.br

3. Ms em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará. E-mail: silvane@ufpa.br
method was chosen by simple statistics, involving average, minimum and maximum values and coefficient of variation for each population and to total sample. The quantification in agarose detected 87.76, 64.4 and 61.03 ng for the people of brief, São Sebastião da Boa Vista and BRS-Pa. The variation was between 0 and 200ng. In fluorímetro the quantifications were 82.06, 82.24 and 49.85 ng for the people of brief, São Sebastião of Boa Vista and BRS-Pa. Getting the variation between 8 and 335.5 ng. The analysis of these methods shows that the two methods are considered efficient, and the agarose the method's practical.

KEYWORDS: Quantification of DNA, Agarose and fluorímetro.

Introdução

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é considerado uma planta de alto interesse socioeconômico tornando-se necessária a análise de fatores que visem à melhoria da produtividade e a qualidade da polpa. Tais como a fertilidade dos solos e o estado nutricional da planta. As populações naturais dessa palmeira ainda são as principais responsáveis pelo abastecimento do mercado de frutos sendo necessária à análise de fatores genéticos que exercem influência sobre cada população.

A extração de DNA vegetal é uma prática utilizada para obtenção de DNA de boa qualidade e quantidade de uma forma rápida e eficaz. A extração de DNA de boa qualidade de qualquer amostra de tecido vegetal é um passo crucial para o desenvolvimento de qualquer técnica de análise direta da molécula de ácido desoxirribonucleico, seja para seqüenciamento, restrição enzimática ou amplificação via PCR. Mas, existe um balanço entre a qualidade e praticidade. Existem vários métodos descritos na literatura, e a escolha depende do balanço entre a praticidade, qualidade e a finalidade de uso do ácido nucléico.

A estimativa da concentração de DNA depende do tipo e quantidade de amostra disponível. A estimativa por gel de agarose consiste no método padrão usado para separar, identificar, analisar, caracterizar e purificar fragmentos de DNA. A eletroforese em gel de agarose é uma técnica simples, rápida e capaz de separar misturas de fragmentos de DNA que não podem ser separados por outros métodos, tais como centrifugação com densidade de gradiente ou por velocidade de sedimentação. A localização do DNA no gel pode ser determinada diretamente. As bandas no gel são coloridas principalmente por Brometo de Etídeo a baixa concentração, que colore por intercalar-se na dupla fita de DNA. Concentrações de até 1 ng de DNA podem ser visualizadas por exame direto de gel na luz ultravioleta. (HILLIS & MORITS 1990).

A estimativa em fluorímetro é feita através de um equipamento que através de uma solução com o corante Hoechst 33258 apresenta alterações nas características de fluorescência na presença de DNA, e permite a estimativa da concentração na solução.

O objetivo desse trabalho é analisar esses dois métodos de quantificação de DNA afim de verificar através estatística simples, envolvendo média, valores mínimos e máximos e coeficiente de variação qual o método mais eficiente e prático.

JUSTIFICATIVA

Verificar a confiabilidade dos dois métodos empregados na quantificação de DNA vegetal.

OBJETIVO

Analisar esses dois métodos de quantificação de DNA afim de verificar o método mais eficiente e prático.

METODOLOGIA UTILIZADA

Foram extraídas 87 amostras de DNA de açazeiro (*Euterpe Oleracea* Mart.) de três populações de açazeiro: duas populações naturais da ilha do Marajó, Pa, localizadas em condições distintas em relação ao Rio Amazonas, sendo uma em Breves e outra em São Sebastião da Boa Vista, e uma melhorada (cultivar BRS-Pará) no laboratório de genética molecular da Embrapa Amazônia Oriental.

Para tanto foram coletados folíolos de 30 matrizes de Breves, 25 de São Sebastião da Boa Vista e 32 da cultivar BRS-Pará para a extração de DNA.

O DNA genômico das populações naturais foi extraído de folíolos secos acondicionados em sílica gel, enquanto que o da população melhorada foi obtido de folíolos frescos recém-colhidos. Antes da extração, os folíolos foram submetidos à desinfecção e posteriormente macerados com o nitrogênio líquido. Cerca de 200mg de pó foram transferidos para tubos de falcon. Adicionando-se em seguida 1000µL de solução extratora. Os tubos foram vortexados e colocados em banho-maria a 60°C, durante 60 minutos. O extrato foi misturado com 1000µL de clorofórmio-álcool isoamil (24:1) para formar emulsão. Após centrifugar por 10 minutos a 4°C e 12 000rpm, a parte superior aquosa foi cuidadosamente isolada e submetida a álcool 95%, o que ocasionou a precipitação do DNA. O material foi centrifugado por 10 minutos a 4°C e 12 000rpm, lavado com 1000µL de etanol 70% para remover sais e, posteriormente, seco à temperatura ambiente por aproximadamente 12 horas. O DNA foi ressuspenso com 500 µL RNase / TE 10ug.mL⁻¹). As amostras foram transferidas do tubo de Falcon para eppendorfs de 1,5ml e armazenadas a -20°C.

A concentração do DNA foi estimada de duas formas: a) em gel de agarose a 1,0% utilizando a comparação do DNA total por meio de três concentrações do DNA lambda (50, 100 e 200 ng/ µL) e b) em fluorímetro, marca Hoefer DyNA Quant 200, por meio da média de duas ou três leituras, conforme a variação de 10% para mais ou para menos da amostra quantificada.

O método mais eficaz foi escolhido com base em estatística simples, envolvendo média, valores mínimos e máximos e coeficiente de variação para cada população e para amostra total.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelo método de eletroforese em gel de agarose foram detectadas concentrações médias de 87,76ng para a população de Breves; 64,4ng para a de São Sebastião da Boa Vista e 61,03ng para a BRS Pará. Nessas populações as quantidades de DNA variaram de 3 a 180ng, 20 a 120ng e de 0 a 200ng para Breves, São Sebastião da Boa Vista e BRS Pará, respectivamente. A maior variação na quantificação de DNA das amostras em cada população foi constatada na população melhorada com CV de 111,38%, enquanto nas populações naturais a variação foi de 48,33% em Breves e 53,23% em São Sebastião da Boa Vista.

No caso das quantificações feitas em fluorímetro foram obtidas médias de 82,06ng para a população de Breves, 82,24ng para a de São Sebastião da Boa Vista e 49,85ng para a BRS Pará. Por esse método a variação nas quantidades de DNA em cada população foi de 8,5 a 243,5ng para Breves, 11,5 a 250ng para São Sebastião da Boa Vista e de 8 a 335,5ng para a população BRS Pará. Nessas populações os coeficientes de variação foram de 70,55% (Breves), 70,80% (São Sebastião da Boa Vista) e de 166,18% (BRS Pará).

De um modo geral, percebe-se que, para as 87 amostras analisadas as quantidades médias de DNA, nos dois métodos, foram bem próximas com 72ng no método comparativo (agarose) e 73,3ng no quantitativo (fluorímetro). A variação na quantidade de DNA obtida foi maior no fluorímetro (89,4%) em relação a agarose (72,4%). Apesar de tudo, nesse último método amostras com DNA em quantidades mínimas foram consideradas como de valores nulos, o que não aconteceu na quantificação feita no fluorímetro. Em consequência disso pode-se sugerir que o método quantitativo seja mais adequado na quantificação de DNA por mensurar valores abaixo de 10ng.

Fazendo-se uma comparação entre os dois métodos observa-se que a agarose mostrou-se como o mais prático na quantificação de DNA, pois a quantificação pode ser feita para várias amostras ao mesmo tempo, porém a leitura desse método é comparativa e requer maior prática do observador para se fazer a comparação com os DNA's lambda. Por outro lado, a quantificação no fluorímetro é um método que mostra o resultado da quantificação de forma digital, tornando fácil e mais eficiente a leitura da concentração do DNA, por se trabalhar com a média de 2 a 3 leituras. Mas, para um grande número de amostras torna-se um método trabalhoso.

Vale ressaltar que em caso de oscilação de energia elétrica os dois métodos sofrem interferência e conseqüentemente há perdas na confiabilidade dos dados. O fluorímetro por ser um aparelho muito sensível, funciona apenas quando a energia elétrica encontra-se estável. A corrida no gel de agarose é prejudicada quando há instabilidade da energia elétrica.

Existem vários métodos descritos em literatura, portanto a escolha depende do balanço entre a praticidade, qualidade e a finalidade de uso do ácido nucléico. Para as amostras de açazeiro testadas a quantificação do DNA feita em agarose e em fluorímetro não apresentaram discrepância entre nos dados obtidos, podendo ambos serem considerados como eficientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUER, D., Warthoe, P., Rohde, L. & Struss, M. (1994) PCR Methods and Applications (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), Supplement, pp. S97–S108.

CHENCHIK, A., Moqadam, L. & Siebert, P. D. (1996) in A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis, ed. Krieg, P. (Wiley, New York), pp. 273–321.

HILLIS, D.M. and C. Moritz. 1990. An overview of applications of molecular systematics. Pp. 502-515 in Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

SAMBROOK - Russel - Molecular Cloning - A Laboratory Manual 3a. Ed. - Editora: Cold Spring Harbor Laboratory Press – 2001

SAMBROOK, J., Fritsh, E. L. & Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 2nd Ed., pp. 8.46–8.49.