

UTILIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DO GIROVÍRUS AVIÁRIO TIPO 2 (AGV2)

Germana V. Osowski¹; Paulo A. Esteves² e Alessandra D'Avila³

¹Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Joaçaba, estagiária da Embrapa Suínos e Aves e bolsista CNPQ/PIBIC, germanavizzottoosowski@hotmail.com

²Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves

³Pós doutorado Empresarial - CNPq

Palavras chave: clonagem, reação em cadeia da polimerase, restrição enzimática, enzima de restrição, plasmídeo, *Escherichia coli*.

INTRODUÇÃO

O girovirose aviário tipo 2 (AGV2) é um vírus recentemente detectado e que, devido a características genômicas, foi sugerido pertencer, à família *Circoviridae*, gênero *Gyrovirus*. O AGV2 encontra-se amplamente distribuído sem ter sido, até o presente momento, associado diretamente com alguma patologia conhecida (1). Contudo, para que seja possível avaliar o real impacto da presença do AGV2 na saúde das aves, é necessária a realização de estudos bem como a padronização de técnicas que possam ser utilizadas para uma melhor compreensão da biologia deste vírus. Dessa forma, o presente trabalho objetivou a utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction) e enzimas de restrição para obtenção da clivagem de DNA plasmidial contendo um fragmento genômico de AGV2 previamente inserido através da técnica de clonagem de DNA. A clonagem é um processo pelo qual fragmentos genômicos de interesse (insertos) são ligados a moléculas circulares de DNA dupla fita (plasmídeos). Após tal ligação a molécula recombinante (plasmídeo + inserto) é inserida em um hospedeiro viável (neste caso a bactéria *Escherichia coli*) em um procedimento denominado transformação, que pode dar-se através de meios físicos (choque térmico) ou elétricos (eletroporação). Após a realização satisfatória da transformação, o plasmídeo recombinante poderá, por exemplo, caso seja um plasmídeo construído para tal finalidade, multiplicar-se (DNA plasmidial + inserto) inúmeras vezes de forma independente do cromossoma bacteriano. Após, o DNA recombinante pode ser obtido através da extração do DNA plasmidial seguida da identificação da presença do inserto, através de procedimentos tais como: PCR ou Clivagem com Enzimas de Restrição. A PCR realiza detecção da presença da região-alvo através da amplificação de tal DNA, utilizando-se primers e uma polimerase recombinante (Taq DNA polimerase) que sintetiza cópias do DNA alvo. Inicialmente ocorre um processo de desnaturação (separação) das moléculas de cadeia dupla do DNA, seguido do pareamento e anelamento dos primers com as regiões específicas do DNA alvo e, finalmente, a etapa de síntese de DNA onde ocorre a cópia do DNA em questão (2). Ao final destas três etapas, repetidas cerca de 30-40 vezes em um equipamento que controla o tempo e a variação da temperatura (termociclador), ocorre um aumento exponencial do número de cópias correspondente a sequência alvo. Já a clivagem com enzima de restrição irá separar o inserto (DNA alvo) do DNA plasmidial. Isso ocorre como resultado do reconhecimento seguido do corte de uma determinada região por parte da enzima de restrição.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas amostras de DNA plasmidial recombinantes previamente testadas para presença do fragmento genômico do AGV2. A transformação bacteriana (clonagem) foi realizada utilizando-se células competentes (Invitrogen™) de *E. coli* e o DNA de interesse (inserto). Após incubação em banho de gelo, foi provocado um choque térmico (42°C), para que o DNA recombinante (plasmídeo + inserto) fosse inserido nas células competentes. Em seguida, as células foram semeadas em meio de cultura sem antibiótico sob agitação (37°C), para que houvesse replicação das *E. coli*. Posteriormente as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura sólido na presença de antibiótico, e mantidas em estufa (37°C) para promoção de crescimento de algumas colônias isoladas, ou seja, os clones. Após, oito clones foram selecionados e incubados em 2 ml de meio de cultura Luria Bertani (LB) constituído de extrato de levedura e mantidas sob agitação (37°C/200 rpm) por cerca de 18 horas. Subsequentemente, após a comprovação visual de crescimento bacteriano em cada tubo, as amostras foram submetidas a extração do DNA plasmidial utilizando-se o kit comercial QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN®), segundo as instruções do fabricante. Após a extração do DNA recombinante foi realizada a detecção da presença do inserto viral no DNA plasmidial através da execução das técnicas de PCR e restrição enzimática, conforme descritas a seguir. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: 99°C/ 1 minuto (desnaturação inicial); 94°C/1 minuto (desnaturação); 62°C/ 1 minuto (anelamento); 72°C/ 1 minuto (extensão ou síntese), seguida de uma extensão final (72°C/ 1 minuto), sendo que as etapas de desnaturação inicial e extensão final ocorrem uma única vez, enquanto que as demais etapas (desnaturação, anelamento e síntese) ocorreram 35 vezes. A seguir, foi realizada a clivagem enzimática objetivando a separação dos fragmentos de DNA (inserto + plasmídeo), utilizando-se da enzima de restrição BIOTECH EcoR I (Ludwig®) (1µl), tampão de enzima (1µl), água MiliQ (5µl) e o DNA alvo (100ng/3µl). Após um período de incubação de 1h (37°C) as amostras de ambas as técnicas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, que possibilita a distribuição dos fragmentos genômicos em ordem decrescente de tamanho. O material foi, então, corado

com Brometo de Etídio e os resultados destes procedimentos foram visualizados sob luz ultra violeta (UV).

RESULTADO E DISCUSSÕES

No presente estudo foi utilizada a técnica de PCR com a Taq DNA polimerase (Figura 1), uma enzima termoestável que tem a capacidade de polimerização de ácidos nucleicos, sintetizando o DNA de acordo com a região específica ligada pelos primers (sentido 5'-3') (3), e a clivagem com a enzima EcoR I (Figura 2) que identifica e corta a seguinte região do DNA: 5' AATT 3' (3' TTAA 5' na fita complementar) (3). A partir destas duas técnicas foi possível verificar a presença do DNA do AGV2 e o DNA plasmidial da *E. coli*, sendo o DNA do plasmídeo visivelmente apresentando maior peso molecular, comparado com o inserto (AGV2).

CONCLUSÕES

Conforme descrito no presente trabalho, os resultados alcançados foram satisfatórios no que diz respeito à clonagem e detecção de AGV2 através das técnicas de PCR e clivagem. Estas ferramentas de diagnóstico podem então ser utilizadas para verificação da dispersão do vírus AGV2 e dessa forma, entender melhor a ecologia destes agentes.

REFERÊNCIAS

1. BRENTANO, L.; MORES, N.; WENTZ, I.; CHANDRATILLEKE, D.; SCHAT, K. A. **Isolation and identification of chicken infectious anemia vírus.** In: Brazil. Avian Diseases, 1991. 793-800 p.
2. FLORES, E. F.; SCHERER, C. **Diagnóstico Viroológico.** In: Virologia Veterinária, 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2008. 43 p.
3. NEW ENGLAND BIOLABS, 2000.01 **Catalog & Technical Reference**, 2000. 140 p.

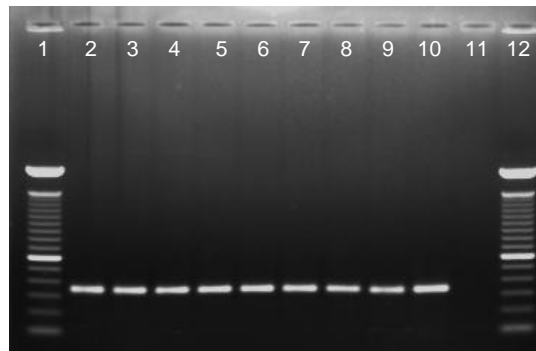


Figura 1. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio visualizado à luz ultravioleta. Canaletas 1 e 12: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen®). Canaletas 2 a 9: amostra de AGV2 (aprox. 360pb). Canaleta 10: controle positivo de AGV2 (aprox. 360pb). Canaleta 11: controle negativo.

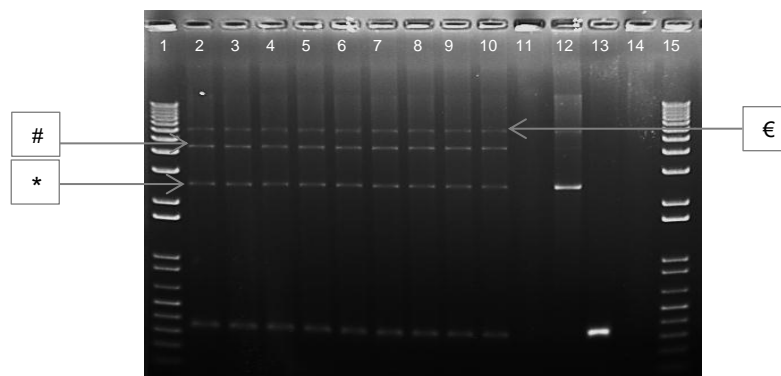


Figura 2. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio visualizado à luz ultravioleta. Canaletas 1 e 15: padrão de peso molecular 1Kb (Invitrogen®). Canaletas 2 a 9: amostras clivadas (inserto com aprox. 360pb). Canaleta 10: controle positivo clivado (inserto com aprox. 360pb). Canaleta 11: controle negativo. Canaleta 12 plasmídeo não clivado. Canaleta 13: PCR do material clonado de AGV2 (aprox. 360pb) Canaleta 14: controle negativo da PCR. * (Plasmídeo linearizado aprox. 2.500pb); # (Plasmídeo relaxado aprox. 4.500pb); € (Plasmídeo enrolado aprox. 6.000pb).