

VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

Amplificação de um fragmento do éxon V do gene do hormônio de crescimento de búfalas (*Bubalus bubalis*)¹

Ana Paula Ribeiro De Jesus² & Paulo Roberto Rodrigues Ramos³

¹Parte da tese de doutorado do primeiro autor, financiada pela Capes

²Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em em Nutrição e Produção Animal - FMVZ/UNESP - Botucatu/SP – Brasil. Rua Prefeito Benedito Martins, 659. Cep 65.500.000 e-mail bt paular@hotmail.com. (98) 8882-7512.

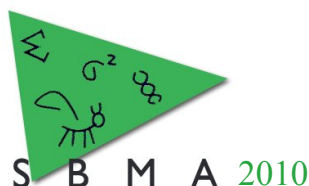
³Orientador e professor titular do Departamento de Biofísica, FMVZ/UNESP - Botucatu/SP – Brasil.

Resumo: A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) é a amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias desta seqüência em um tubo de ensaio. A execução da técnica de PCR é muito simples, desde que as condições da reação já estejam padronizadas. Este trabalho teve como objetivo a padronização do protocolo de amplificação de parte do gene do Hormônio de Crescimento de búfalas. Utilizou-se a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram coletadas amostras de sangue de 84 búfalas mestiças (Murah, Jafarabadi) (*Bubalus bubalis*) leiteiras, com idades variando entre 4 e 9 anos. O DNA foi extraído de acordo com a técnica do DNAzol (Life Technologies), seguindo todo protocolo recomendado pela empresa. Foram utilizados os pares de oligonucleotídeos designados por MITRA (1995), os quais geram um produto de 223 pares de bases (pb). Primeiramente testou-se vários ciclos e temperaturas de anelamento do par de “primers”, tentando achar o melhor resultado. Utilizou-se 5 µl de PCR buffer, 1 µl de dNTP (20 mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl do primer forward (20 mM), 1,0 µl do primer reverse (20 mM), 0,25 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl), acrescentando água até um volume final de 40 µl por tubo. Para o carregamento do gel usou-se 1 µl de DNA na concentração de 55 µg/ml mais 9 µl do mix descrito acima. Variamos a temperatura de anelamento de 53,3° C a 58,8° C, todas as temperaturas foram testadas com 30, 35, 40 e 45 ciclos de PCR. Após essa primeira tentativa, observamos que a 45 ciclos e com temperaturas mais altas, obtínhamos melhores resultados. Resolveu-se alterar a quantidade de Taq DNA polimerase de 0,25 µl para 0,30 µl. Variamos a temperatura de anelamento de 58,7°C a 62°C, com 45 ciclos de PCR, e observamos o resultado. O melhor resultado de amplificação foi obtido com 45 ciclos a 61° C e com 0,25 µl de taq DNA polimerase.

Palavras-chave: amplificação, gh, búfalos, gen

Amplification of a growth hormone gene Exon V fragment in water buffaloes (*Bubalus bubalis*)

Abstract: The Polymerase Chain Reaction (PCR) is the enzymatic amplification of a specific DNA sequence; seeking the production of millions copies of this sequence in a test tube. The execution of the PCR technique is very simple, since the conditions of the reaction are already standardized. This work had as objective the amplification protocol standardization of part of the Growth Hormone gene in water buffaloes, using the technique PCR. Blood samples of 84 females water buffaloes were collected (Murrah, Jafarabadi) (*Bubalus bubalis*), with ages varying between 4 and 9 years. DNA was extracted in agreement with the DNAzol technique (Life Technologies), following the protocol recommended by the company. Oligonucleotides pairs designated by MITRA (1995) were used, which generate a product of 223 base pairs (bp). Firstly, several cycle's numbers and annealing primers pairs temperatures were tested, trying to find the best result. 5 µl of PCR buffer, 1 µl of dNTP (20 mM) were used, 1,5 µl of MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl of the forward primer (20 mM), 1,0 µl of the reverse primer (20 mM), 0,25 µl of Taq DNA polymerase (5 U/µl), increasing water until a final volume of 40 µl for tube. For the gel shipment, 1 µl of DNA was used in the concentration of 55 µl/ml plus 9 µl of the mix described above.



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

We varied the annealing temperature from 53,3°C to 58,8°C; all of the temperatures were tested with 30, 35, 40 and 45 cycles of PCR. After that first attempt, we observed that to 45 cycles and with higher temperatures, we obtained better results. It was decided to alter the amount of Taq DNA polymerase from 0,25 µl to 0,30 µl. We varied the annealing temperature from 58,7°C to 62°C, with 45 PCR cycles. The best amplification result was obtained with 45 cycles to 61°C and with 0,25 µl of taq DNA polymerase.

Keywords: amplification, gh, buffalos, gene

Introdução

A reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) é a amplificação enzimática de uma seqüência específica de DNA, visando a produção de milhões de cópias desta seqüência em um tubo de ensaio. A PCR explora a capacidade de duplicação do DNA. Uma fita simples de DNA é usada como molde para a síntese de novas cadeias complementares sob a ação da enzima polimerase do DNA, capaz de adicionar os nucleotídeos presentes na reação, segundo a fita molde. A polimerase do DNA requer, entretanto, um “ponto de início” ligado à fita molde que servirá de apoio para que os nucleotídeos subseqüentes sejam adicionados. Esse ponto de início da síntese é fornecido por um oligonucleotídeo que se hibridiza (se anela) à fita molde simples, o qual é denominado “*primer*”. Dessa forma, a região do DNA genômico a ser sintetizada é definida pelos “*primers*”, que se anelam especificamente às suas seqüências completares na fita molde, delimitando o fragmento de DNA que se deseja amplificar. A escolha dos “*primers*” é um dos pontos críticos para a eficiência do método de PCR. Atualmente existem programas de computadores que nos auxiliam nesta tarefa. Fornecendo-se a seqüência das bases no fragmento que se deseja amplificar, o programa indica as regiões mais favoráveis para os “*primers*”. Além disso, em função da composição de bases e do comprimento dos “*primers*” escolhidos, o programa nos fornece as condições ideais de temperatura, tempo e salinidade para a PCR. A execução da técnica de PCR é muito simples, desde que as condições da reação já estejam padronizadas (FARAH, 1997). O presente trabalho teve como objetivo amplificar parte do éxon V do gene do hormônio de crescimento de búfalos e padronizar o protocolo para esta amplificação.

Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de sangue de 84 búfalas mestiças (Murah, Jafarabadi) (*Bubalus bubalis*) leiteiras, com idades variando entre 4 e 9 anos, criadas sob manejo semi-extensivo, pertencentes à fazenda Santa Eliza, localizada no município de Dourado, estado de São Paulo. Foram coletados 5 ml de sangue por punção da veia jugular em tubos “vacutainer”, contendo EDTA, durante o período da manhã e mantidos sob refrigeração até chegar ao Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Física e Biofísica, IB, UNESP, Botucatu. O DNA foi extraído de acordo com a técnica do DNAzol (Life Technologies), seguindo todo protocolo recomendado pela empresa. Para amplificar o fragmento do gene do hormônio de crescimento de búfalos; número de acesso ao Genbank AJO11533 (<http://locus.jouy.inra.fr/cgi-bin/lgbc/mapping/common/main.pl?BASE=buffalo>) foram utilizados os pares de oligonucleotídeos designados por MITRA (1995), os quais geram um produto de 223 pares de bases (pb). Os “*primers*” foram analisados quanto a sua fidelidade ao gene GH de búfalos através do acesso ao banco de dados de seqüência de nucleotídeos disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health-USA), no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. A síntese dos “*primers*” foi realizada pela empresa Invitrogen. Primeiramente testou-se vários ciclos e temperaturas de anelamento do par de “*primers*”, tentando achar o melhor resultado. Utilizou-se 5 µl de PCR buffer, 1 µl de dNTP (20 mM), 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 µl do primer forward (20 mM), 1,0 µl do primer reverse (20 mM), 0,25 µl de Taq DNA polimerase (5 U/µl), acrescentando água até um volume final de 40 µl por tubo. Para o carregamento do gel usou-se 1 µl de DNA na concentração de 55 µg/ml mais 9 µl do mix descrito acima. Variamos a temperatura de anelamento de 53,3°C a 58,8°C, todas as temperaturas foram testadas com 30, 35, 40 e 45 ciclos de PCR (Figura 1).

Após essa primeira tentativa, testamos o seguinte protocolo: 5 μ l de PCR buffer, 1 μ l de dNTP (20 mM), 1,5 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 1,0 μ l do primer forward (20 mM), 1,0 μ l do primer reverse (20 mM), 0,30 μ l de Taq DNA polimerase (5 U/ μ l), acrescentando água até um volume final de 40 μ l por tubo. Utilizou-se 1 μ l de DNA na concentração de 55 μ g/ml mais 9 μ l do mix descrito acima. Variamos a temperatura de anelamento de 58,7°C a 62°C, com 45 ciclos de PCR, e observamos o resultado. Foram utilizados géis de agarose a 3% corados com brometo de etídio, preparado com 300 ml de tampão TBE (1X) + 9 gramas de agarose, levados por 3 minutos ao microondas até completa dissolução. Posteriormente o gel foi depositado na cuba e deixado em repouso em temperatura ambiente, até completa gelificação. A corrida foi feita em cuba horizontal submarina, contendo TEB 1X, 120 V, por aproximadamente 3 horas. Uma alíquota de 10 μ l do mix de amplificação foi diluído num volume de 2 μ l de tampão de corrida e adicionados aos poços do gel. Para referência de peso molecular e identificação das bandas do fragmento amplificado, todos os géis foram flanqueados de um padrão de peso molecular 50 pb.

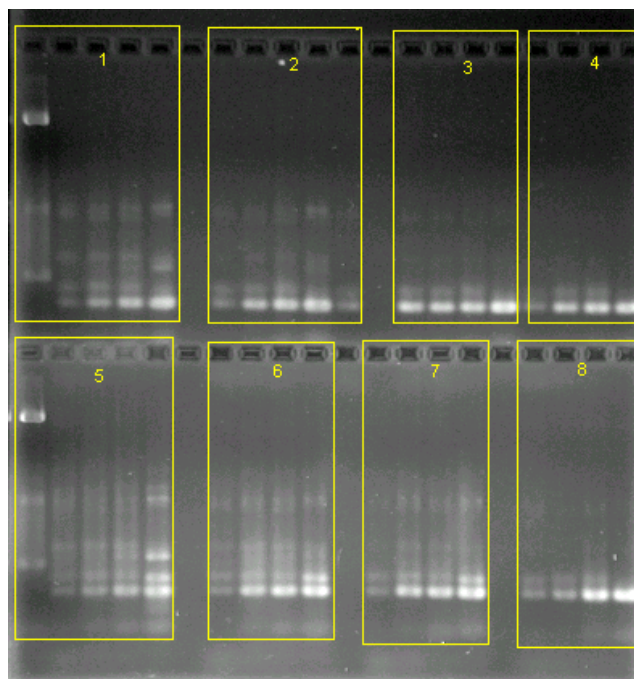
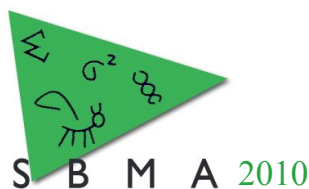


Figura 1 Padronização de ciclos e temperatura de anelamento do par de “primers”. 1ª coluna de todos os quadros – padrão de peso molecular de 50 pares de base. Temperatura variando de 53,3° C, na segunda coluna, 55,5° C na terceira, 56,8° C na quarta e 58,8° C na quinta coluna de todos os quadros. Quadro 1 e 2 – 30 ciclos; Quadro 3 e 4 – 35 ciclos; Quadro 5 e 6 – 40 ciclos; Quadro 7 e 8 – 45 ciclos.

Resultados e Discussão

Tentando diminuir a presença de bandas inespecíficas e aumentar o sinal de amplificação, variou-se a quantidade de Taq DNA polimerase. Dos protocolos testados, o melhor resultado foi obtido quando usamos 5 μ l de PCR buffer, 1 μ l de dNTP (20 mM), 1,5 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 1,0 μ l do primer forward (20 mM), 1,0 μ l do primer reverse (20 mM) e 0,25 μ l de Taq DNA polimerase (5 U/ μ l). Com 45 ciclos de PCR e temperatura de anelamento de 61° C. Adotando o seguinte programa de PCR: 1ª) 94° C por 3



VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

minutos, 2^a) 94°C por 45 segundos, 3^o.) 61° C por 1 minuto, 4^o) 70° C por 1 minuto, 5^o) voltar para o 2^o passo 45 vezes, 6^o) 4° C por 2 minutos, 7^o) fim.

Conclusões

Vários fatores podem levar a problemas de amplificação, dentre os quais, concentrações inadequadas de reagentes como MgCl₂, dNTPs, tampão, “primers”, Taq polimerase e DNA. Além da importância de se quantificar o DNA extraído. O tamanho do fragmento e a presença de impurezas também levam a falhas na amplificação.

Agradecimentos

A todos que contribuíram na execução deste trabalho, em especial ao meu orientador professor Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos.

Literatura citada

FARAH, S. B. **DNA segredos e mistérios**. São Paulo: SARVIER, p. 121 – 125, 1997.
MITRA, A., SCHLEE, P., BALAKRISHNAN, C. R., et al. Polymorphisms at growth-hormone and prolactin loci in indian cattle and buffalo. **J. Anim. Breed. Genet.**, v. 112, n. 1, p. 71-74, 1995.