

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Meio-Norte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Anais

# II Jornada Científica

Embrapa Meio-Norte



Teresina, 14 e 15 de setembro de 2016

Embrapa Meio-Norte  
Teresina, PI  
2016

**Embrapa Meio-Norte**

Av. Duque de Caxias, 5.650, Bairro Buenos Aires  
Caixa Postal 01  
CEP 64006-220, Teresina, PI  
Fone: (86) 3198-0500  
Fax: (86) 3198-0530  
www.embrapa.br/meio-norte  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição**

Embrapa Meio-Norte

**Comitê de Publicações**

Presidente: *Jefferson Francisco Alves Legat*

Secretário-administrativo: *Jeudys Araújo de Oliveira*

Membros: *Ligia Maria Rolim Bandeira, Flavio Favaro Blanco, Luciana Pereira dos Santos Fernandes, Orlane da Silva Maia, Humberto Umbelino de Sousa, Pedro Rodrigues de Araujo Neto, Carolina Rodrigues de Araujo, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Karina Neob de Carvalho Castro, Francisco das Chagas Monteiro, Francisco de Brito Melo, Maria Teresa do Rêgo Lopes, José Almeida Pereira*

Normalização bibliográfica e editoração eletrônica: *Orlane da Silva Maia*

Capa: *Luciana Pereira dos Santos Fernandes*

**1ª edição**

Publicação digitalizada (2016)

**Revisores Ad hoc (Embrapa Meio-Norte)**

*Aderson Soares de Andrade Junior, Adriana Mello de Araújo, Alitieni Moura Lemos Pereira, Ana Lúcia Horta Barreto, Angela Puchnick Legat, Braz Henrique Nunes Rodrigues, Bruno de Almeida Souza, Cândido Athayde Sobrinho, Edson Alves Bastos, Fabíola Helena dos Santos Fogaça, Francisco José de Seixas Santos, Geraldo Magela Côrtes Carvalho, João Avelar Magalhães, Jorge Minoru Hashimoto, José Ângelo Nogueira de Menezes Júnior, José Lopes Ribeiro, Lúcio Flavo Lopes Vasconcelos, Maria Clideana Cabral Maia, Maurisrael de Moura Rocha, Paulo Fernando de Melo Jorge Vieira, Paulo Henrique Soares da Silva, Raimundo Bezerra de Araújo Neto, Ricardo Montalvan Del Aguila, Rosa Maria Cardoso Mota de Alcântara, Tânia Maria Leal, Teresa Herr Viola, Valdenir Queiroz Ribeiro*

**Comissão organizadora**

Coordenador: *Edvaldo Sagrilo*

Membros: *José Oscar Lustosa de Oliveira Júnior, Bruno de Almeida Souza, Flávio Favaro Blanco, Izabella Cabral Hassum, Jefferson Francisco Alves Legat, Paulo Sarmanho da Costa Lima, Danielle Maria Machado Ribeiro Azevedo, Juliana Priscila Sussai, Magda Cruciol, Orlane da Silva Maia, Francisco de Assis David da Silva*

A linguagem escrita, os conceitos e opiniões emitidos nos resumos constantes desta publicação, são de inteira responsabilidade dos respectivos autores. A Comissão Organizadora não assume responsabilidades pelos dados e conclusões apresentadas nos trabalhos publicados nos anais desta jornada.

**Todos os direitos reservados.**

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

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Meio-Norte

---

Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Meio-Norte (2. : 2016 : Teresina, PI).

Anais da II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte / II Jornada Científica da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, 13 a 14 de setembro de 2016. – Teresina : Embrapa Meio-Norte, 2016. 126 p.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cpamn.embrapa.br/jornada2016/downloads/EMBRAPAEBOOK.pdf>>.

1. Pesquisa científica. 2. Iniciação científica. 3. Agricultura. 4. Pecuária. 5. Tecnologia. I. Título. II. Embrapa Meio-Norte.

---

CDD 607

© Embrapa 2016

# AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO RNA APÓS TRATAMENTO COM DNASE I E PADRONIZAÇÃO DA RT-QPCR EM CANA-DE-AÇÚCAR

Jailson de Araújo Santos<sup>1</sup>; Gizele de Andrade Luz<sup>2</sup>; Kelly Pires de Oliveira<sup>3</sup>; Leonardo Furtado de Oliveira<sup>4</sup>; Aderson Soares de Andrade Júnior<sup>5</sup>; Sérgio Emilio dos Santos Valente<sup>6</sup>; Paulo Sarmanho da Costa Lima<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduado do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI. [j.santosp@hotmai.com](mailto:j.santosp@hotmai.com)

<sup>2</sup>Mestre em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

<sup>3</sup>Graduada do Curso de Ciências Biológicas Universidade Estadual do Piauí, Teresina, PI.

<sup>4</sup>Mestrando em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

<sup>6</sup>Professor Doutor da Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI.

## RESUMO

O sucesso de estudos de expressão gênica, dependem da pureza e integridade do RNA, uma vez que mesmo quantidades mínimas de DNA contaminante (<1%) podem produzir um sinal falso-positivo de amplificação em uma reação de RT-PCR. Diante do exposto, este estudo teve como objetivo testar três diferentes concentrações de DNase I (0.02, 0.04 e 0.06 µL/ng de RNA) para a digestão de DNA contaminante presente em RNA de cana-de-açúcar e utilizar o RNA purificado na padronização da RT-qPCR. Os resultados indicaram que as três concentrações proporcionaram reduções significativas nas concentrações de DNA e RNA. Dessa forma, se concluiu que a menor concentração, 0,02 µL de DNase, foi a recomendada para purificação do RNA em cana-de-açúcar, uma vez que altas concentrações de DNase não aumentam a eficiência da digestão de DNA e apenas tornam o processo de purificação mais oneroso. Além disso, se observou que as condições das amostras de RNA tratadas com DNase permitiram a execução da RT-qPCR.

**PALAVRAS-CHAVE:** purificação de RNA, DNA contaminante, PCR em tempo real.

## INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) representa uma das culturas de maior importância para a produção de açúcar, biomassa e álcool do mundo (GUO et al., 2014). Estudos de expressão gênica, utilizam a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real – RT-PCR (LING et al., 2014), a qual representa um avanço em termos de precisão e reprodutibilidade da quantificação de DNA e RNA (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). Entretanto, o sucesso desses estudos depende da pureza e integridade do RNA, uma vez que mesmo quantidades mínimas de DNA contaminante (<1%) podem produzir um sinal falso-positivo de amplificação na RT-PCR (SAH et al., 2014; TAVARES et al., 2011).

O método de extração orgânica é um dos mais comuns para isolamento de RNA. No entanto, o RNA isolado por meio desse método apresenta-se frequentemente contaminado por proteínas, componentes celulares, solventes orgânicos ou etanol. Em casos de contaminação por DNA, realiza-se o tratamento do RNA com a enzima DNase (desoxirribonuclease) que degrada o DNA e previne resultados falso-positivos (OÑATE-SÁNCHEZ; VICENTE-CARBAJOSA, 2008).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de testar três concentrações de DNase para digestão de DNA contaminante presente em amostras de RNA de cana-de-açúcar, a fim de determinar a concentração da enzima que proporcionasse a obtenção de RNA purificado em

quantidades e qualidade adequadas para futuros estudos de expressão gênica e padronização da RT-qPCR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta das amostras e isolamento do RNA**

Coletou-se o tecido foliar de três cultivares de cana-de-açúcar (C1, C2 e C3) provenientes do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal do Piauí, em Teresina. A extração foi realizada segundo o manual “Concert™ Plant RNA Reagent” (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA).

### **Quantificações**

O RNA foi quantificado e qualificado por meio de três métodos: espectrofotometria de absorção, fluorimetria e eletroforese em gel de agarose. O primeiro foi com o equipamento NanoDrop®2000 (Thermo Scientific, EUA), no qual calculou-se os valores das razões  $A_{260/280}$  (concentração de ácidos nucleicos relativa a proteínas) e  $A_{260/230}$  (concentração de ácidos nucleicos relativa a metabólitos secundários e componentes de tampões), cujo valores geralmente aceitos são de 1.8 a 2.2 e 1.7 a 2.2, respectivamente. Em seguida utilizou-se o fluorímetro (Qubit® 2.0 – Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EUA. Realizou-se também a análise de RNA em gel de agarose a 1%.

### **Tratamento com DNase**

O RNA extraído foi tratado com DNase livre de RNase (*DNase I Amplification grade*, Thermo Fisher Scientific, EUA). As concentrações de DNase testadas nos ensaios foram de 0,02 (T1 = tratamento 1), 0,04 (T2 = tratamento 2) e 0,06  $\mu\text{L}/\text{ng}$  de RNA (T3 = tratamento 3).

### **Avaliação da eficiência do tratamento com DNase**

Amostras de RNA foram submetidas à PCR convencional em uma reação de 10  $\mu\text{L}$ . As reações foram realizadas em um termociclador modelo Veriti 96-Well (Applied Biosystems, EUA). Os produtos das amplificações foram separados em gel de agarose a 1,5%.

### **Síntese do cDNA**

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 9  $\mu\text{L}$  de RNA tratado com DNase em uma reação de 20  $\mu\text{L}$  utilizando o High Capacity RNA-to-cDNA kit (Applied Biosystems, CA, EUA).

### **Análise das condições do RNA após os tratamentos com DNase por meio da RT-qPCR**

Os níveis de expressão de mRNA foram avaliados em ensaio de SYBR Green utilizando o equipamento Applied Biosystems StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, EUA). As amplificações de PCR foram realizadas em duplicatas em reações de 15  $\mu\text{L}$ . Na placa, os genes alvos (PSII 10 e HSP), o gene de referência (GAPDH) e controles negativos foram incluídos.

### **Análise dos Dados**

As variáveis não-paramétricas (concentração e pureza de RNA) foram analisadas por ANOVA complementado pelo Teste-T.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das leituras específicas das quantidades de RNA e DNA realizadas no fluorímetro, verificou-se que houve reduções em relação às concentrações antes e após os tratamentos (Tabela 1).

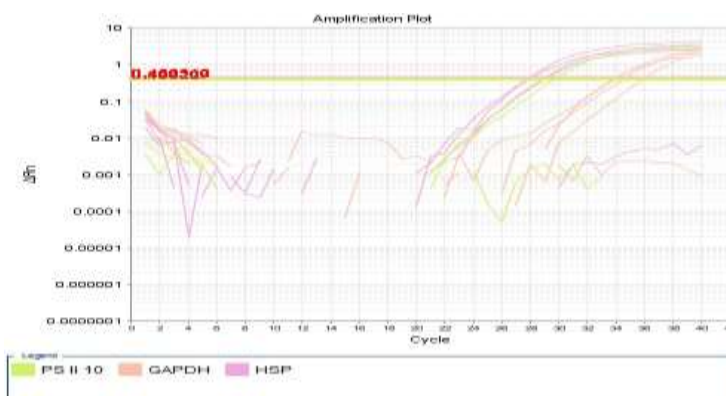
**Tabela 1** – Quantificação de RNA e DNA no fluorímetro de três cultivares de cana-de-açúcar (C1, C2 e C3) e total das reduções nas concentrações após os tratamentos com diferentes concentrações de DNase: T1 (0,02 µL), T2 (0,04 µL) e T3 (0,06 µL).

| Valores              | Concentrações de DNase (µL) |      |       |              |      |       |              |      |       |
|----------------------|-----------------------------|------|-------|--------------|------|-------|--------------|------|-------|
|                      | T1 (0,02 µL)                |      |       | T2 (0,04 µL) |      |       | T3 (0,06 µL) |      |       |
|                      | C1                          | C2   | C3    | C1           | C2   | C3    | C1           | C2   | C3    |
| <b>DNA (ng/µL)</b>   |                             |      |       |              |      |       |              |      |       |
| Concentração inicial | 125,8                       | 21,6 | 56,2  | 70,2         | 33,7 | 56,2  | 89,8         | 21,6 | 123,2 |
| Concentração final   | 3,0                         | 0,0  | 1,87  | 2,30         | 0,8  | 1,87  | 2,91         | 0,20 | 3,60  |
| Total das reduções   | 87%                         | 100% | 90%   | 90%          | 92%  | 89%   | 90%          | 97%  | 86%   |
| <b>RNA (ng/µL)</b>   |                             |      |       |              |      |       |              |      |       |
| Concentração inicial | 24,2                        | 21,6 | 6,38  | 24,2         | 21,6 | 6,38  | 24,2         | 21,6 | 6,38  |
| Concentração final   | 0,371                       | 0,0  | 0,468 | 0,852        | 0,0  | 0,302 | 0,452        | 0,0  | 0,332 |
| Total das reduções   | 98%                         | 100% | 92%   | 96%          | 100% | 98%   | 98%          | 100% | 94%   |

A partir desses resultados, observa-se que as concentrações de RNA diminuíram significativamente após os três tratamentos ( $p=0,000033$ ), no entanto as reduções entre os três tratamentos não apresentaram diferença significativa ( $p=0,85$ ). Huang et al. (1996) demonstraram que métodos para a digestão de DNA contaminante em amostras de RNA com DNase que realizam a inativação térmica da enzima a 95° C durante 5 min, também afetam a integridade do mRNA.

Se por um lado observou-se uma redução significativa ( $p=0,005$ ) das concentrações de DNA após os tratamentos, do outro, não se observou diferenças significantes entre os três tratamentos ( $p=0,87$ ), uma vez que as reduções nas quantidades de DNA foram aproximadamente iguais.

Pela análise do gráfico da curva de amplificação (Figura 1), permite-se inferir a respeito da eficiência de amplificação de cDNA transcrito do RNA após os tratamentos com DNase (WONG; MEDRANO, 2005), na qual verificou-se diferença entre os ciclos iniciais de amplificações das duas amostras utilizadas no ensaio e boa definição das fases exponencial e platô.



**Figura 1.** Curva de amplificação do PCR em tempo real realizado com duas amostras de RNA de cana-de-açúcar tratadas com DNase utilizando três diferentes primers (PSII 10 e HSP como genes alvos e GAPDH como gene de referência.  $C_T$  – Cycle Threshold).

Analisando a Figura 1, percebe-se que na amostra C1 as amplificações com o gene HSP iniciaram no ciclo 28, ao passo que na amostra C2 as amplificações com o gene PSII 10 iniciaram durante o ciclo 29. O valor do  $C_T$  para as duas amostras foi de 0,46056.

## CONCLUSÕES

A concentração de 0,02  $\mu$ L de DNase foi a recomendada para purificação do RNA em cana-de-açúcar de RNA, uma vez que altas concentrações de DNase não aumentam a eficiência da digestão de DNA e apenas tornam o processo de purificação mais oneroso.

**Agradecimentos:** Aos colaboradores do Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte.

## REFERÊNCIAS

- GUO, J. et al. The choice of reference genes for assessing gene expression in sugarcane under salinity and drought stresses. **Scientific Reports**, Berlin, v. 4, Article number 7042, Nov. 2014. Disponível em: <[http://www-nature-com.ez103.periodicos.capes.gov.br/articles/srep07042?WT.ec\\_id=SREP-631-20141118](http://www-nature-com.ez103.periodicos.capes.gov.br/articles/srep07042?WT.ec_id=SREP-631-20141118)>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- HUANG, Z. et al. Optimization of Dnase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. **BioTechniques**, Notick, v. 20, n. 6, p. 1012-1014, 1016, 1018-1020, 1996.
- LING, H. et al. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e97469, 2014.
- NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 7, n. 33, p. 10-13, jul./dez. 2004. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/pcr.pdf>>. Acesso em: 20 jul. 2016.
- OÑATE-SÁNCHEZ, L.; VICENTE-CARBAJOSA, J. DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. **BMC Research Notes**, London, v. 1, n. 1, p. 93, Oct. 2008. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/1/93>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- SAH, S. K. et al. Rapid and reliable method of high-quality RNA extraction from diverse plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 21, p. 3129-3139, Oct. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2014.521329>>. Acesso em: 13 jul. 2016.
- TAVARES, L. et al. Comparison of different methods for DNA-free RNA isolation from SK-N-MC neuroblastoma. **BMC Research Notes**, London, v. 4, n. 1, p. 3, 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/3>>. Acesso em: 10 jul. 2016.
- WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantification. **BioTechniques**, Notick, v. 39, n. 1, p. 75-85, July 2005. Disponível em: <[http://pages.vassar.edu/joschwarz/files/2012/02/review\\_rt-pcr\\_2005.pdf](http://pages.vassar.edu/joschwarz/files/2012/02/review_rt-pcr_2005.pdf)>. Acesso em: 15 jun. 2016.