

*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 DE ENZIMAS POLIMERASES PARA AMPLIFICAÇÃO DE DNA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Trichogramma* WESTWOOD (HYMENOPTERA, TRICHOGRAMMATIDAE)

Jéssica Barbara Vieira Viana¹; Ranyse Barbosa Querino da Silva²; Paulo Sarmanho da Costa Lima³.

¹Mestranda em Genética e Melhoramento, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, jessicabarbara@hotmail.com

²Pesquisadora da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI, ranyse.silva@embrapa.br

³Pesquisador da Embrapa Meio-Norte, Teresina, PI.

RESUMO

Os problemas enfrentados ao se trabalhar com espécies do gênero *Trichogramma* envolvendo técnicas de biologia molecular, estão relacionados às baixas concentrações do DNA e sua qualidade inadequada. Para garantir reações em cadeia da polimerase (PCR) eficientes e precisas com moldes de DNA que apresentem baixas concentrações e qualidade comprometida, existem enzimas DNA polimerases capazes de superar tais problemas. As enzimas isoladas de *Pyrococcus furiosus* apresentam alta fidelidade. Além desta, existem outras como as originárias da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* as quais podem sintetizar extensos segmentos de DNA em curto prazo. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da eficiência da polimerase obtida de *Thermus aquaticus* e a polimerase isolada de *Pyrococcus furiosus*. Os acessos de espécies de *Trichogramma* que não amplificaram em reações de PCR com a polimerase obtida a partir de *Thermus aquaticus*, obtiveram resultados positivos quando submetidos a PCRs com a polimerase purificada de *Pyrococcus furiosus*.

PALAVRAS-CHAVE: atividade exonucleásica, PCR, inibidores.

INTRODUÇÃO

As técnicas de biologia molecular têm se destacado no estudo de espécies crípticas de *Trichogramma* (SAMARA et al., 2008). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é a técnica que permite a duplicação de milhares de cópias de um segmento de DNA na presença da enzima DNA polimerase; a eficiência da mesma depende da qualidade e da concentração dos ácidos nucléicos (OLIVEIRA et al., 2007). As dificuldades na execução de estudos com *Trichogramma* que aplicam técnicas de biologia molecular, estão associadas às baixas concentrações de DNA extraídos destes organismos e sua qualidade inadequada, devido ao seu tamanho diminuto.

Para garantir reações de PCR eficientes e precisas com moldes de DNA que apresentem baixas concentrações, qualidade comprometida e presença de inibidores, existem enzimas DNA polimerases com características que possibilitam superar esses fatores limitantes. A polimerase isolada de *Pyrococcus furiosus* apresenta maior fidelidade na PCR quando comparada com outras DNA polimerases, é considerada 50x mais precisa e possui atividade exonucleásica de correção no sentido 3'-5' (KIM et al., 2007). Outra DNA polimerase, isolada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*, possibilita sintetizar uma fita de DNA com comprimento de mil

bases em cerca de 30 segundos a 72°C, porém estas são desprovidas de atividade exonucleásica de revisão 3'-5' (HAKI; RAKSHIT, 2003; VIEILLE; ZEIKUS, 2001).

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo realizar um estudo comparativo da eficiência da polimerase obtida de *Thermus aquaticus* e a polimerase isolada de *Pyrococcus furiosus* em PCR com DNA, extraído com a resina Chelex 100, de insetos do gênero *Trichogramma*.

MATERIAL E MÉTODOS

A extração de DNA foi realizada por meio da resina Chelex 100 (5%) a partir de um indivíduo inteiro. Em um tubo de 0,2mL contendo o exemplar acrescentou-se 80µL de Chelex, 8µL de proteinase K (20mg/ml) e incubou-se à 95°C por 20 minutos. Decorridos 10 minutos as amostras foram centrifugadas por 45s e posteriormente transferidas para um eppendorf e armazenadas a -20°C.

A quantificação foi realizada por meio da mensuração pelo espectrofotômetro NanoDrop™, fluorímetro Qubit, e pela análise de gel de agarose a 0,8%, corado com GelRed, sendo utilizado um marcador padrão (Lambda) com quantidade de DNA conhecida.

Para amplificação da região espaçadora ITS2 do rDNA, foram usados os iniciadores F – 5' TGTGAACTGCAGGACACATG 3' e R – 5' GTCTTGCCTGCTCTGAG 3'. As reações com a polimerase obtida de *Thermus aquaticus* foram realizadas em um volume final de 10µL contendo, 2,4µL de amostra de DNA (concentração variável), 1µL de PCR (10x) buffer (Tris·Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂), 1,5µL de MgCl₂ (25mM), 0,8µL de dNTP (10mM), 0,1µL de solução Q (5x), 0,2µL de cada iniciador, 0,052µL de polimerase (5U/µL) e 3,748µL de água ultra pura. O programa de amplificação para as reações consistiu de uma desnaturação inicial do DNA a 94°C por 3 minutos, seguido de 33 ciclos que incluiu 40 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos a 55°C (temperatura de anelamento) e 45 segundos a 72°C (polimerização). Decorridos os 33 ciclos ocorreu uma extensão final de 5 minutos a 72°C. Os acessos que não proporcionaram amplificação com a polimerase obtida de *Thermus aquaticus* foram submetidos a reações contendo a polimerase originada de *Pyrococcus furiosus* em um volume final de 10µL contendo, 2,4µL de amostra de DNA (concentração variável), 2 µL de PCR (5x) buffer (Tris·Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂), 0,1µL de MgCl₂ (25mM), 0,1 µL de dNTP (10mM), 0,5µL de cada iniciador, 0,3µL de DMSO, 0,1µL de polimerase (5U/µL) e 3,9µL de água ultra pura. O programa de amplificação para as reações consistiu de uma desnaturação inicial do DNA a 98°C por 30 segundos, seguido de 30 ciclos que incluiu 10 segundos a 98°C (desnaturação), 25 segundos a 55°C (temperatura de anelamento) e 25 segundos a 72°C (polimerização). Decorridos os 30 ciclos ocorreu uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que os acessos de espécies de *Trichogramma* que não amplificaram em reações de PCR com a polimerase obtida a partir de *Thermus aquaticus*, obtiveram resultados positivos quando submetidos a PCRs com a polimerase purificada de *Pyrococcus furiosus* (Figura 1).

A resina Chelex 100 como método de extração de DNA tem como atividade quelar íons que são catalisadores na quebra do DNA. Devido a essa característica, a resina Chelex 100 inibe a atividade do MgCl₂²⁺ utilizado na PCR como cofator da enzima polimerase, consequentemente, a enzima perde sua função de polimerização (BAREA et al., 2004). Diferente da enzima polimerase obtida a partir de *Thermus aquaticus*, a enzima polimerase originada de *Pyrococcus furiosus* apresenta uma atividade exonucleásica de correção no sentido 3'-5' e são tolerantes à inibidores de PCR, proporcionando maior confiabilidade e minimizando falhas de reação. A mesma apresenta uma taxa de erro extremamente baixa, de aproximadamente 50x inferior à

DNA polimerase obtida a partir de *Thermus aquaticus*. Além disso, esta polimerase apresenta alta capacidade de processamento, as quais adicionam mais nucleotídeos por etapas de polimerização em comparação a outras polimerases, com isso as mesmas exigem tempos de extensão extremamente curtos e consequentemente tempos de protocolos reduzidos (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

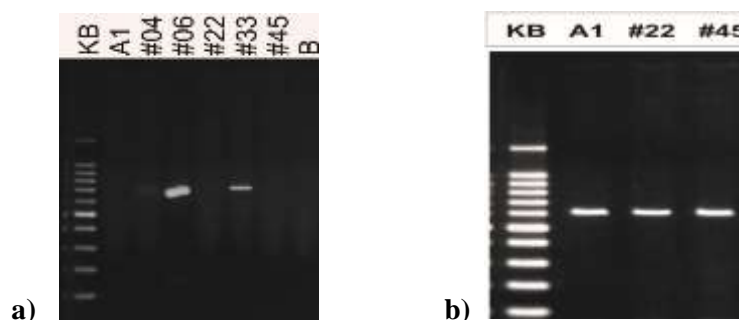


Figura 1. Perfis de amplificação obtidos em PCR utilizando enzimas polimerases obtidas a partir de *Thermus aquaticus* (a) e de *Pyrococcus furiosus* (b).

CONCLUSÕES

As enzimas polimerases originadas de *Pyrococcus furiosus* são mais adequadas para reações de PCR contendo como molde extrações de DNA de *Trichogramma* que apresentem inibidores como os obtidos com a resina Chelex 100, por apresentarem uma alta fidelidade, atividades exonucleásicas de correção no sentido 3'-5' e serem tolerantes a inibidores de PCR. Embora as enzimas polimerases extraídas de *Thermus aquaticus* tenham apresentado resultados positivos em reações de PCR com DNA de *Trichogramma*, são ineficientes em alguns casos em que o molde de DNA de *Trichogramma* contenha inibidores de PCR.

Agradecimentos: Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Embrapa Meio-Norte.

REFERÊNCIAS

- BAREA, J. A. et al. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). **Revista brasileira hematologia e hemoterapia**, Santos, v. 26, n. 4, p. 274-281, 2004.
- HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. R. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.
- KIM, Y. J. et al. Cloning, purification, and characterization of a new DNA polymerase from a hyperthermophilic archaeon, *Thermococcus* sp. NA1. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 17, n. 7, p. 1090-1097, 2007.
- OLIVEIRA, M. C de S. et al. **Fundamentos teóricos-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 38 p.
- SAMARA, R. et al. Genetic divergence of *Trichogramma aurosom* Sugonjaev and Sorokina (Hymenoptera: Trichogrammatidae) individuals based on ITS2 and AFLP analysis. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 132, n. 3, p. 230-238, 2008.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Phusion DNA polymerases**. Waltham, 2016. Disponível em: < <https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-molecular-biology-products/phusion.html#order>>. Acesso em: 23 jul. 2016.

VIELLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability . **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.