

## FORMAMIDA, TWEEN E GLICEROL COMO OTIMIZADORES DE REP-PCR

Maycon Eduardo Nicoletti<sup>(1)</sup>, Gustavo Emygdio Halfen<sup>(2)</sup>, Fernando Adami Tcacenco<sup>(3)</sup>.  
<sup>1</sup>Biólogo, Bacharel, Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri – Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, e-mail: maycon\_bio@hotmail.com. Bolsista do CNPq. <sup>2</sup>Graduando em Ciências Biológicas, Universidade do Vale do Itajaí (Univali), Bolsista do CNPq. <sup>3</sup>Eng. Agr., Ph. D., Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Epagri.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica *in vitro* que permite a amplificação exponencial de seqüências específicas de DNA. A Rep-PCR, uma das muitas variações da PCR convencional, é uma ferramenta molecular muito utilizada no estudo de diversidade genética de patógenos (Louws *et al.*, 1994; 1999), tendo sido adaptada por George *et al* (1998) para o estudo do polimorfismo das regiões intermediárias do elemento repetitivo (Pot-2) de *P. grisea*. Esta técnica é altamente específica, porém existem fatores que podem comprometer a análise genética, como a formação de produtos inespecíficos, o aparecimento de bandas com baixa intensidade, ou a ausência destas. Estes problemas podem estar relacionados às temperaturas de ciclagem, presença de inibidores, assim como a utilização de concentrações inadequadas de reagentes na reação. Portanto, variações do protocolo de PCR devem ser testadas e adequadas a diferentes situações, e por isso torna-se importante a otimização e a busca pelo aumento da especificidade e qualidade da técnica. Conforme Frackman *et al* (1998), o uso de aditivos nas reações de PCR pode trazer incremento na eficiência, especificidade e consistência nos resultados esperados. Em geral esses aditivos ou otimizadores são proteínas, detergentes ou solventes orgânicos que agem promovendo a melhoria na quantidade e qualidade do produto de amplificação, cada um de forma diferente (Santos *et al*, 2002). A partir desse conhecimento, muitos otimizadores de PCR têm sido frequentemente utilizados, tais como a formamida, o Tween e o glicerol, entre outros.

Entretanto, na literatura, não há consenso para a concentração ideal desses otimizadores em PCR, sendo necessários testes para cada tipo de reação e DNA. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de várias concentrações de formamida, Tween 20, Tween 80 e glicerol em reações de Rep-PCR de *P. grisea*.

Para a obtenção das amostras de DNA, foram coletados fragmentos de papel-filtro com sobreposição de micélio provenientes de cepas de *P. grisea* cultivadas em placas de petri com 20mL de meio BDA sólido, conforme metodologia proposta por Scoz *et al.* (2006). As amostras foram armazenadas em tubos de 2mL e maceradas com nitrogênio líquido; a extração do material genético foi baseada no protocolo descrito por Scott *et al.* (1993). Posteriormente foi realizado tratamento com RNase A. A quantificação e a qualificação do DNA foi feita através de Fluorômetro (Bio-Rad VersaFluor™ corante Hoescht 33258) e corrida eletroforética por 90 min em géis de agarose 0,8% corados com SYBR® Safe (Invitrogen).

O DNA genômico de *P. grisea* foi submetido à técnica de Rep-PCR em duplicata, em quatro experimentos independentes, compostos de diferentes concentrações dos aditivos mencionados: **(i) Tween 20:** 0%, 0,1%, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1%; **(ii) Tween 80:** 0%, 0,1%, 0,25%, 0,50%, 0,75% e 1%; **(iii) Glicerol:** 0%, 1%, 2%, 5%, 8% e 10%; e **(iv) Formamida:** 0%, 1,25%, 2,5%, 5%, 6,5% e 10%. A amplificação enzimática foi realizada nas condições descritas por George *et al.* (1998), modificadas para acomodar os tratamentos acima.

Todos os aditivos testados apresentaram efeito positivo na Rep-PCR, quando comparados às testemunhas, principalmente em baixas concentrações. Porém nas maiores concentrações, o glicerol (10%) e a formamida, (a partir de 5%) causou efeito inibitório.

**Tween 20 e 80:** nos experimentos (i) e (ii), foram detectadas diferenças na intensidade e consistência dos fragmentos amplificados, quando comparados à testemunha, sendo o incremento crescente com o aumento da concentração até 0,5%, não diferindo entre os

tratamentos a partir deste (0,5%, 0,75% e 1%). Este resultado apresentou-se similar para ambos os experimentos (Tween 20 e Tween 80; Figura 1). Os resultados obtidos demonstram que a concentração indicada, para esses aditivos, deve ser no mínimo 0,5% em reações de Rep-PCR de *P. grisea*. No presente trabalho foi testado o Tween, devido à sua propriedade de detergente não-iônico, que pode auxiliar na estabilização da *Taq* polimerase e diminuir a formação de estrutura secundária do DNA (Gelfand, 1990). O mesmo autor informa que uma contaminação de 0,01% por sodium dodecyl sulfate (SDS), utilizado nos protocolos de extração de DNA, pode reduzir em 10% a atividade da *Taq* polimerase, e a adição de Tween inibe esse efeito negativo sobre a PCR.

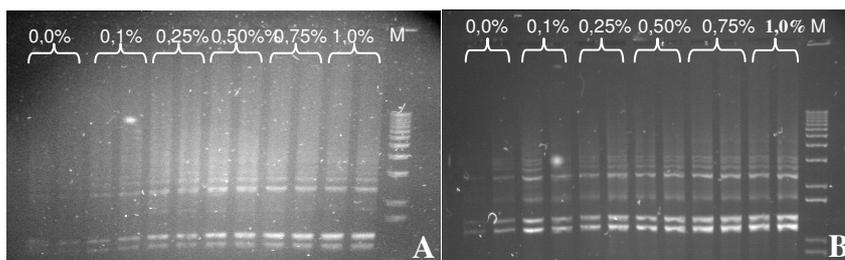
**Glicerol:** para o glicerol, observou-se melhora considerável nos tratamentos de 1%, 2% e 5% quando comparados à testemunha, não havendo diferenças entre essas concentrações (Figura 2). A concentração de 10%, porém, foi inibitória à amplificação enzimática. A função do co-solvente glicerol na PCR não é conhecida com exatidão, porém presume-se que auxilia a estabilizar a *Taq* polimerase e a contrapor-se aos efeitos negativos de inibidores.

**Formamida:** os resultados com formamida apontam que esse reagente deve ser utilizado em baixa concentração, pois o efeito otimizador está a 1,25% (Figura 3), sendo, a partir desta concentração, inibitória à reação. A formamida, assim como o DMSO (dimethyl sulfoxide), são tolerados a baixas concentrações na PCR e podem ajudar a amplificar seqüências ricas em C-G, pois facilitam a separação das fitas, melhorando a acessibilidade da *Taq* DNA Polimerase bem como a sensibilidade das fitas a iniciadores e a sondas.

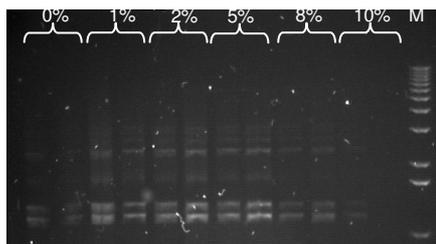
Os resultados aqui apresentados apontam para a importância da utilização de otimizadores de PCR, particularmente para protocolos que exigem alta especificidade e que resultam em produtos longos, como no presente caso. Futuros experimentos poderão testar a combinação desses otimizadores, visando à definição das condições ideais para Rep-PCR para o elemento repetitivo Pot-2.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FRACKMAN, S.; KOBBS, G.; SIMPSON, D.; STORTS, D. Betaine and DMSO: enhancing agents for PCR. **Promega notes**, v.65, p.27-30, 1998.
- GELFAND, D.H.; WHITE, T.J. Thermostable DNA polymerases. pp. 129-141 in: **PCR Protocols** (Innis, Gelfand, Sninsky and white, eds.) academic Press, New York, 1990.
- GEORGE, M.L.C.; NELSON, R.J.; ZEIGLER, R.S.; LEUNG, H. Rapid population analysis of *Magnaporthe grisea* by using rep-PCR and endogenous repetitive DNA sequences. **Phytopathology**, v.88, n.3, p.223-229, 1998.
- KOVÁROVÁ, M.; DRÁBER, P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. **Nucleic Acids Research**, v.28, n 13, e70, 3p, 2000.
- LOUWS, F. J.; FULBRIGHT, D. W.; STEPHENS, C.T.; BRUIJN, F.J. de. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathogens and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.7, p.2286-2295, 1994.
- LOUWS, F.J.; RADEMAKER, J.L.W.; BRUIJN, F. J. de. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Review Phytopathology**, v.37, p.81-125, 1999.
- SANTOS, S.T. dos; DIREITO, I.C.N.; TEIXEIRA, K.R. dos S. Aplicação da PCR na microbiologia ambiental. pp 21-26 in: **Isolamento e amplificação de DNA de amostras de solo como ferramenta para avaliar a diversidade das populações de Bactérias em solos agrícolas**. Seropédica - RJ: Embrapa Agrobiologia, 2002. 36p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 148).
- SCOTT, R.P.; ZEIGLER, R.S.; NELSON, R.J. A procedure for miniscale preparation of *Pyricularia grisea* DNA. **International Rice Research Notes**, v.18, n.1, p.47-48, 1993.
- SCOZ, L.B.; NICOLETTI, M.E.; MIURA, L.; TCACENCO, F.A. Nova metodologia para obtenção de material genético para estudos de biodiversidade de *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais**

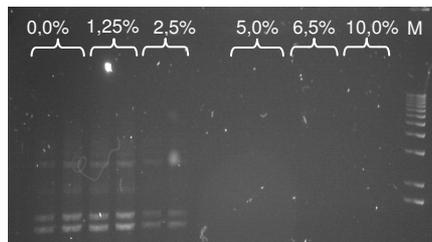


**Figura 1.** Produtos de Rep-PCR derivados de reações com diferentes concentrações de Tween 20 (A) e Tween 80 (B) por reação. Os fragmentos foram submetidos à corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen). M = marcador de peso molecular de 1Kb Plus Invitrogen.



**Figura 2.** Produtos de Rep-PCR derivados de reações com diferentes concentrações de glicerol por reação. Os fragmentos foram submetidos à corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen). M = marcador de peso molecular de 1Kb Plus Invitrogen<sup>®</sup>.

**Figura 3.** Produtos de Rep-PCR derivados de reações com diferentes concentrações de Formamida. Os fragmentos foram submetidos à corrida eletroforética em géis de agarose 0,9% por 150 min e corados com SYBR<sup>®</sup> Safe (Invitrogen). M = marcador de peso molecular de 1Kb Plus Invitrogen.



Agradecimentos: Ao CNPq, pelas bolsas concedidas a M.E.N. e G.E.H. (Projeto 507096/2004-5).