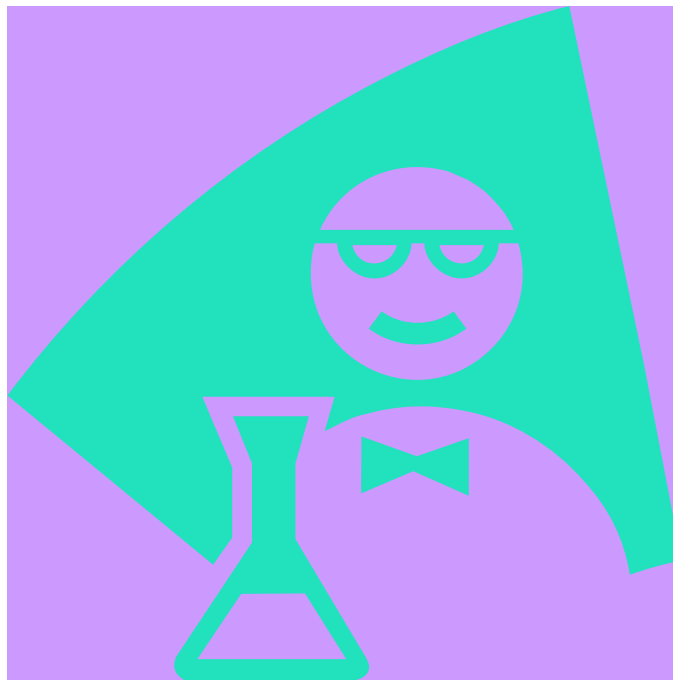


ESTUDOS DE DIVERSIDADE GENÉTICA EM CAMARÕES UTILIZANDO  
MARCADORES MOLECULARES

Manual Prático



Patrícia Domingues de Freitas

São Carlos, São Paulo, abril de 2005

## Prefácio

O objetivo deste guia é fornecer subsídios metodológicos para aqueles que estão iniciando os estudos de variabilidade genética em camarões, preferencialmente, da espécie *Litopenaeus vannamei*.

Ele se inicia descrevendo de forma bastante sucinta algumas normas de conduta sobre as condições e o ambiente de trabalho, sendo, posteriormente, abordados aspectos relacionados à coleta do material e a procedimentos básicos de Biologia Molecular, como extração e amplificação de DNA via PCR.

A intenção de elaborar um texto desta natureza decorreu da necessidade em disponibilizar um material que fornecesse informações sob como conduzir um estudo de determinação de variabilidade em estoques de *L. vannamei*, através da utilização de marcadores moleculares de RAPD e microssatélites.

Neste Guia, noções básicas relacionadas às metodologias moleculares utilizadas pelo nosso grupo de pesquisa são apresentadas para que outros centros também possam utilizar.

## CAPÍTULO I



### Normas de Segurança e de Conduta

## 1. Normas de Segurança e de Conduta

O jaleco e as luvas são peças imprescindíveis em todo e qualquer experimento da Biologia Molecular. É importante que a pessoa que irá conduzir os experimentos se proteja contra reagentes nocivos à sua saúde procurando usar sempre jaleco, luvas apropriadas e em algumas circunstâncias máscaras para face e óculos protetores contra a luz ultravioleta (UV).

Substâncias como fenol e brometo de etídeo, além dos raios UV emitidos pelo trans-iluminador, são consideradas altamente cancerígenas e por tanto extremamente danosas. Todo e qualquer material com alto grau de periculosidade deve ser manuseado com total responsabilidade. Inclui-se neste item o descarte de reagentes tóxicos, que não deve ser realizado de forma irresponsável sempre que considerados agressivos ao meio-ambiente.

O manuseio de fenol e clorofórmio, e se possível também de brometo de etídeo, deve se dar preferencialmente em capela, utilizando máscara protetora para evitar sua inalação. O ambiente de trabalho deve ser extremamente asséptico. As bancadas devem estar sempre limpas e todo material utilizado, como graal, pistilos e tubos falcon, incluindo vidrarias, deve ser muito bem lavado e autoclavado. Alguns reagentes também necessitam de autoclavagem após o seu preparo e antes de sua utilização. É importante acondicionar todo o material de uso em condições apropriadas (temperatura e umidade) para garantir sua perfeita conservação.

## CAPÍTULO II



### Coleta Do Material

## 2. Coleta Do Material

A coleta do material deve também ser conduzida de maneira responsável, uma vez que constitui condição primária para execução do estudo proposto. O estado de conservação do tecido facilitará ou não a obtenção de bons resultados. Tecidos em perfeito estado de conservação podem garantir o sucesso das etapas subseqüentes dos experimentos realizados em laboratório. Portanto, a fixação do mesmo deve se dar de forma correta e eficiente. Pedacos muito grandes de tecido devem ser reduzidos a pedacos menores para promover uma melhor conservação do material e evitar a deteriorização de camadas mais internas.

No caso de camarões, a musculatura abdominal é considerada como sendo o tecido mais apropriado para análises de DNA, uma vez que fornece uma boa quantidade de tecido muscular e conseqüentemente excelente quantidade de células contendo material genético. Entretanto, para ser coletada, necessita que o animal seja sacrificado, o que muitas vezes inviabiliza a realização da coleta.

Uma excelente alternativa é utilizar o segundo conjunto de apêndices abdominais, denominados pleópodos. Os pleópodos podem ser facilmente destacados do corpo do camarão, utilizando-se apenas o auxílio de uma pinça. Eles possibilitam a sobrevivência do animal e ainda apresentam grande capacidade de regeneração.

Para cada exemplar estudado devem ser coletados de um a dois pleópodos, dependendo do seu tamanho (indivíduos maiores apresentam pleópodos maiores). O material pode ser fixado em 1ml de etanol 95%, dentro de tubos plásticos de 2 ml, sendo posteriormente mantido em freezer, à -10°C, até o momento da extração de DNA.

Pode-se também conservar o material diretamente em nitrogênio líquido. Entretanto, esta opção nem sempre é a mais viável, Caso seja possível, o material deve ser etiquetado e mantido no próprio galão de nitrogênio ou posteriormente acondicionado em deep freezer a -80 °C.

Os tecidos que não foram submetidos à extração de DNA devem ser estocados em um banco de tecidos no laboratório, para que possam ser utilizados em estudos posteriores.

Além do cuidado com a conservação do material coletado deve-se ter também especial atenção com o número amostral (N). Muitos trabalhos sugerem que se colete um N próximo a 500 indivíduos Entretanto, esta opção, na maioria das vezes, é inviável e se constitui um fator limitante, podendo inclusive inviabilizar a concretização do estudo.

Neste caso, uma alternativa é trabalhar com um N variando entre 50 a 100 animais, valores considerados também aceitáveis, principalmente para populações cativas, que em geral apresentam número populacional relativamente reduzido em comparação com populações naturais.

Caso não seja possível amostrar um número de indivíduos próximo a nenhuma das duas opções mencionadas, deve-se coletar não menos que 20 a 30 exemplares.

Durante a realização da coleta do material biológico propriamente dita, é importante coletar o maior número de informações a cerca do objeto de estudo. A idade, o peso e o sexo do animal são características que podem ser úteis numa etapa futura do trabalho como, por exemplo, na interpretação e análise dos resultados obtidos.

Todos os exemplares devem ser devidamente pesados e sexados. A determinação do sexo, quando possível, pode ser realizada através de visualização direta das estruturas relacionadas ao sistema reprodutivo de cada sexo: a presença de petasma nos machos e de tólico nas fêmeas.

Aspectos relacionados aos estoques estudados também são de extrema relevância. É importante saber o local de origem dos animais e a geração na qual eles se encontram. Esta informação nem sempre é precisa, portanto, é necessário estabelecer algum critério para caracterizar os diferentes estoques, para não dificultar a interpretação e análise dos dados moleculares. Nem sempre plantéis que estão em F0 em um determinado centro de cultivo correspondem de fato a animais selvagens.

Cada indivíduo deve receber um número de registro e cada plantel uma nomenclatura adequada para posterior identificação e acompanhamento destes, junto aos centros de cultivo.



Uma sugestão de nomenclatura é que esta contenha as iniciais do centro de cultivo e a geração na qual os animais se encontram. Dados relativos à performance do estoque e ao manejo que é realizado em cada laboratório também são fundamentais.

No momento da coleta pode-se aplicar um questionário contendo perguntas que direcionem a entrevista. O questionário deve ser constituído por perguntas direcionadas ao setor de maturação e elaborado para verificar a provável origem dos plantéis e o tipo de manejo adotado, bem como suas particularidades (víroses, taxa de sobrevivência etc.). Posteriormente à coleta do material e dos dados, deve-se iniciar os experimentos em laboratório, os quais incluem a extração, quantificação e amplificação do DNA.

#### **Guia de Entrevistas:**

---

#### QUESTIONÁRIO PARA DIAGNÓSTICO DOS PLANTÉIS

---

01. Quantos plantéis de reprodução existem?
  02. Qual o local de origem desses plantéis utilizados?
  03. Os animais de um mesmo plantel têm a mesma origem e idade?
  04. Em que estágio os animais são transferidos para os viveiros de reprodutores?
  05. Há algum critério de seleção utilizado na escolha dos indivíduos que irão compor os plantéis de reprodutores?
  06. Qual a idade em que os camarões são transferidos para o laboratório de maturação?
  07. Quando os animais são transferidos para o laboratório de maturação é feito algum tipo de seleção?
  08. Os camarões mantidos em um mesmo tanque possuem mesma origem e idade?
  09. Quantos casais são utilizados em cada tanque de maturação e por quanto tempo?
  10. Quantas vezes, em média, uma mesma fêmea pode contribuir para uma dada produção?
-

## CAPÍTULO III



**Extração De DNA De Tecidos Sólidos**

**Quantificação**

**Acondicionamento Das Amostras**

### 3. Extração De DNA De Tecidos Sólidos

A extração de DNA genômico de tecidos sólidos pode ser realizada seguindo-se diferentes metodologias ou ainda utilizando-se uma diversidade de "kits" de purificação de DNA, atualmente, disponíveis no mercado.

Em nosso laboratório, apesar de termos utilizado uma série de protocolos, aqueles que apresentaram os melhores resultados para pleópodos de camarão foram os métodos descritos por Sambrook et al. (1989), baseado na utilização de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, e por Aljanabi e Martinez (1997) que utiliza tampão salino para isolar o DNA.

#### 3.1. Extração de DNA de acordo com Sambrook et al. (1989)

Como comentado anteriormente, os pleópodos do animal podem variar consideravelmente de tamanho, podendo-se utilizar um ou mais pleópodos para realização da extração de DNA. Nesta técnica deve-se utilizar, aproximadamente, dois pleópodos ou cerca de 200mg de tecido.

O tecido deve ser colocado em um graal e macerado em nitrogênio líquido, com a ajuda de um pistilo. Após a maceração, 5ml de solução de digestão, composta por 0,4M de NaCl; 0,1M de EDTA (pH 8,0); 100µl/ml de RNase; 0,1% de SDS, devem ser adicionados ao tecido macerado e transferidos para tubos plásticos de 15ml, sendo, posteriormente, mantido por 1 hora em banho-maria a 37°C.

Após o período determinado, 100µl/ml de Proteinase K devem ser adicionados à solução e o tubo transferido para banho-maria a 50°C por 2 horas e 30 minutos. Durante sua permanência em banho-maria, o material deve ser periodicamente homogeneizado através de movimentos suaves realizados com as mãos. Esta fase tem como finalidade promover a digestão de componentes celulares como lipídeos, proteínas e RNA.

Após esta etapa, o tubo deverá permanecer à temperatura ambiente, adicionando-se a este igual volume (5ml) de solução de extração, composta por fenol, clorofórmio e álcool isoamilico na proporção de 25:24:1. O material deve ser homogeneizado delicadamente por aproximadamente 30 minutos e, posteriormente, centrifugado por 15 minutos em centrífuga a 3.000 rpm. O fenol deverá arrastar restos de tecidos para o fundo do tubo, juntamente com as proteínas digeridas.

A fase aquosa contendo o DNA e resíduos de proteínas permanecerá numa camada superior separada do fenol por uma fina película. Os tubos devem ser cuidadosamente retirados da centrífuga para que as fases não se misturem e o sobrenadante deve ser transferido para um novo tubo com o auxílio de uma micropipeta. Esta etapa deve ser realizada com bastante cuidado para que a interface não seja aspirada.

À solução transferida deve ser adicionado 1M de NaCl para promover a precipitação das proteínas e posteriormente cerca de 2 volumes de etanol 100% gelado. O tubo deve ser vertido algumas vezes para promover a

precipitação do DNA e, em seguida, centrifugado a 3.000 rpm por mais 15 minutos.

O DNA em contato com o etanol poderá formar uma nuvem que freqüentemente pode ser observada a olho nu, antes mesmo da centrifugação. Caso esta nuvem não tenha sido inicialmente formada, um pellet no fundo do tubo poderá ser visualizado após a etapa de centrifugação.

O sobrenadante deverá ser descartado e ao pellet formado, adicionado cerca de 3ml de etanol 70% gelado, para retirada de resquícios de reagentes. O material deve ser novamente centrifugado por 15 minutos e o sobrenadante descartado cuidadosamente para que o pellet não se desprenda do fundo do tubo. O DNA pode ser mantido overnight em estufa a 37°C e posteriormente resuspendido em 1ml de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA mM pH 8,0), devendo ser transferido para tubos plásticos de 1ml e acondicionados em freezer a temperatura de -10°C.

A extração de DNA baseada na utilização de fenol, apesar de bastante eficiente pode, no entanto, comprometer a qualidade do DNA caso resíduos de fenol permaneçam na amostra. O fenol pode inibir a ação da enzima *Taq* DNA Polimerase impedindo o processo de amplificação de DNA.

Para minimizar o seu efeito deve-se diminuir ao máximo a concentração de DNA utilizado na PCR. Testes realizados mostraram que concentrações de DNA de até 6ng/ $\mu$ l podem ser utilizadas em reações que utilizam

oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias (RAPD). Desta forma, além de diminuir a concentração de fenol, diminui-se também a quantidade de outros contaminantes que por ventura possam vir a comprometer o sucesso da reação.

Outra observação que deve ser ressaltada em relação a utilização desta técnica diz respeito à qualidade do fenol utilizado. O fenol é um reagente bastante vulnerável ao processo de oxidação (calor e luz) e uma vez oxidado pode também comprometer a reação de PCR. Neste caso, uma reextração do material pode ser realizada, utilizando-se um fenol em bom estado de preservação.

Apesar dos eventuais problemas aqui mencionados, esta técnica possibilita a obtenção de boas quantidades de DNA (100 a 300ng/ $\mu$ l), e de baixas concentrações de proteínas e ácido ribonucléico. O tratamento com proteinase K é uma etapa crucial para garantir o sucesso da PCR, uma vez que o alto teor de polissacarídeos, presentes no tecido de camarão, pode comprometer a qualidade do DNA.

### **3.2. Extração de acordo com Aljanabi e Martinez (1997)**

A extração de DNA baseada na utilização de tampão salino é um procedimento que apresenta algumas vantagens em relação a outros protocolos. É uma técnica extremamente rápida e fácil de ser executada em laboratório. Ela apresenta um custo operacional relativamente baixo e também baixo grau de toxicidade.

Neste protocolo cerca de 50 a 100mg de tecido (dois pleópodos pequenos ou um pleópodo grande) deve ser macerada, em quantidade suficiente de nitrogênio líquido, com o auxílio de um bastão de vidro. O tecido deve ficar bem fragmentado para facilitar a ação das soluções utilizadas.

Em geral costuma-se realizar esta etapa em tubos plásticos de 2ml, previamente autoclavados, devido ao pequeno volume das soluções utilizadas. Entretanto pode-se também fazer uso de um graal e posteriormente transferir o material para um ependorfe.

Após a maceração, 400µl de tampão salino, contendo NaCl 0,4M; Tris-HCl 10mM (pH=8,0) e EDTA 0,2 mM (pH=8,0), devem ser adicionados e o material deve ser novamente macerado. Em seguida, deve-se adicionar 40µl de SDS (20%) e 8µl de Proteinase K (20 mg/ml), vertendo-se cuidadosamente o tubo para homogeneizar a solução.

O tubo deve permanecer em banho-maria a 55-65°C por aproximadamente 4 horas. Entretanto, este tempo pode variar de 2 a 4 horas. Durante sua permanência em banho-maria é importante que o ependorfe seja levemente agitado a cada 30 ou 60 minutos. Estes movimentos facilitarão a ação dos reagentes e dissolução do material.

Após o banho-maria, 300µl de NaCl 6M devem ser adicionados às amostras, sendo estas "vortexadas" por 30 segundos em velocidade máxima e, posteriormente, centrifugadas por 30 minutos a 10.000 g.

Após a centrifugação, duas fases irão se formar; uma inferior contendo restos de tecido e uma superior onde estará o DNA e também restos protéicos digeridos. Os tubos devem ser cuidadosamente retirados da centrífuga para que as fases não se misturem e o sobrenadante transferido para um novo tubo com o auxílio de uma micropipeta. Esta etapa deve ser realizada com bastante cuidado para que a interface não seja aspirada. Caso isso ocorra, o tubo pode novamente ser centrifugado por 5 a 10 minutos, retornando em seguida ao protocolo padrão.

Ao novo tubo contendo o sobrenadante, deve-se adicionar igual volume de isopropanol, misturando-se as soluções através de movimentos suaves realizados com as mãos. É importante que a quantidade de isopropanol adicionada seja a mais próxima possível da quantidade de sobrenadante existente no tubo, pois, é nesta etapa que irá ocorrer precipitação do DNA. Muitas vezes é possível observar o aparecimento de um filamento esbranquiçado ainda nesta fase. Algumas vezes, entretanto, esse filamento pode não aparecer.

Para otimizar a precipitação do DNA, as amostras devem ser incubadas por 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente centrifugadas por 20 minutos a  $10.000\text{g}$ . Após a centrifugação poderá ser visualizado um pequeno pellet formado no fundo do tubo. O sobrenadante deve ser descartado com cuidado para que o pellet não se desgrude e seja perdido. Em seguida,  $300\mu\text{l}$  de etanol 70% devem ser adicionados ao tubo e a amostra centrifugada por mais 5 minutos



a 10.000 g. O etanol irá lavar o pellet, retirando do DNA restos de sais e outras substâncias indesejadas.

O etanol 70% deve ser descartado novamente e o material levado para secar em estufa a 37°C. O tempo de secagem pode variar de aproximadamente 2 horas a overnight. Este tempo poderá influenciar na solubilidade e no grau de degradação do material, portanto, deve-se observar se o tempo de secagem não está interferindo na qualidade do DNA obtido.

Após a secagem, um volume de 100µl a 300µl de TE deve ser adicionado ao tubo para ressuspender o DNA. A quantidade de TE utilizada irá depender do tamanho do pellet formado e da concentração de DNA que se deseja obter. Caso haja necessidade, pode-se também adicionar nesta etapa a enzima RNase (10mg/µl), juntamente com o tampão TE. Entretanto a sua utilização é opcional.

Com esta técnica quantidades variando entre 100ng/µl e 200ng/µl de DNA costumam ser obtidas. Muitas vezes o material pode se apresentar um pouco degradado e com RNA, não interferindo, no entanto nos processos de amplificação via PCR.

#### 4. Quantificação De DNA

Após a extração de DNA, o material deve ser devidamente quantificado. A quantificação pode ser realizada utilizando-se um espectrofotômetro ou um "ladder" que, além do peso molecular, também indique a concentração de cada um dos seus fragmentos. Independente do tipo de quantificação utilizada, é importante, entretanto, que seja adotada uma única metodologia, visando-se minimizar variações entre os padrões de quantificação.

Caso não haja a possibilidade de rotineiramente fazer uso das opções acima citadas, uma vez que muitos laboratórios não possuem espectrofotômetro e que marcadores desta natureza costumam ser relativamente caros, um DNA padrão previamente quantificado poderá ser utilizado como parâmetro de quantificação.

No nosso laboratório costumamos adotar como metodologia para quantificação de DNA a utilização do *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Este é aplicado em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo (10mg/ml), juntamente com as amostras de DNA a serem quantificadas. Posteriormente à corrida, o gel é analisado em transiluminador e sua imagem captura pelo sistema de fotodocumentação Edas 290 (kodak).

O DNA quando impregnado com o brometo de etídeo sob luz ultra-violeta (UV), emitida pelo transiluminador, permite a visualização de uma banda de alto peso molecular, correspondente à molécula de DNA.

Quando o DNA encontra-se degradado ao invés de uma única banda bem definida e evidente pode-se visualizar um rastro difuso ao longo do gel. Resíduos de RNA também podem ser observados em agarose, quando verificada a presença de um fragmento de menor peso molecular.

#### **4.1. Eletroforese em Gel de agarose 0,8% (Quantificação com Ladder)**

Para a preparação de um gel de agarose 0,8% deve-se adicionar 0,8g de agarose para 100ml de tampão TBE (1x) em um erlenmeyer e posteriormente aquecê-lo em forno microondas. Após a fervura, o gel deve ser mantido por alguns minutos à temperatura ambiente, para que o brometo de etídeo possa ser adicionado. Antes que o mesmo entre em processo de solidificação este deve ser vertido em cuba de eletroforese devidamente montada.

Após a polimerização do gel, os pentes e os suportes utilizados para facilitar a retenção do gel na cuba até o mesmo atingir o seu estado sólido devem ser retirados. Quantidade suficiente de tampão de corrida (TBE 1x) deve ser adicionada a cuba, devendo o gel e os eletrodos, que conduzirão a corrente, permanecerem devidamente submersos. As amostras de DNA poderão então ser aplicadas.

Para facilitar a aplicação das amostras no gel pode-se fazer uso de uma fita adesiva que deve ser colocada sobre a bancada para servir de suporte e facilitar a mistura entre o DNA e o tampão de aplicação. Este possui glicerol em sua composição, componente que possibilita a perfeita aplicação do

DNA no gel. Tampões com quantidades de glicerol inadequadas podem fazer com que o DNA não permaneça retido na canaleta, emergindo para a superfície e se dispersando ao longo do tampão de corrida. Além desta importante característica os corantes utilizados na sua preparação permitem o acompanhamento do processo de migração do DNA no gel e durante a corrida.

No caso de utilização do *Low Mass* para parâmetro de quantificação deve-se aplicar um mínimo de 2 $\mu$ l de ladder para 1 $\mu$ l de tampão de aplicação. Para a amostra a ser quantificada deve-se utilizar apenas 1 $\mu$ l de DNA para 0,5 $\mu$ l de tampão. Quantidades exageradas de azul de bromo fenol podem se impregnar no gel de agarose e promover borrões nas imagens formadas.

O DNA e o tampão de aplicação devem ser devidamente misturados com a ajuda de uma micropipeta e, posteriormente, aplicados nas canaletas do gel. É importante observar se o gel não contém muitas impurezas, que possam interferir na corrida e também se os pocinhos onde serão aplicadas as amostras não estão perfurados. A fonte de voltagem deve ser devidamente ajustada à cuba e após a corrida (1 hora a 96volts) o gel deve ser levado ao transiluminador para visualização dos fragmentos. Desta forma, através da comparação entre a intensidade das bandas do ladder e das amostras pode-se estimar a concentração de DNA.

#### 4.2. Quantificação com espectrofotômetro

Se a opção de escolha for pela utilização do espectrofotômetro deve-se respeitar os procedimentos básicos de utilização do aparelho. Diluições e calibrações utilizadas durante o processo de quantificação devem ser seguidas devendo-se ao final da leitura fazer as devidas correções.

O espectrofotômetro é um aparelho de uso relativamente simples e seu princípio se baseia nas diferenças de comportamento óptico entre as biomoléculas. O DNA absorve comprimentos de onda numa faixa de 260nm enquanto que proteínas absorvem em comprimentos de 280nm. Apesar de considerado preciso, quantificações de DNA realizadas em espectrofotômetro podem subestimar a quantidade de DNA de uma amostra, principalmente, quando esta apresentar presença de contaminantes.

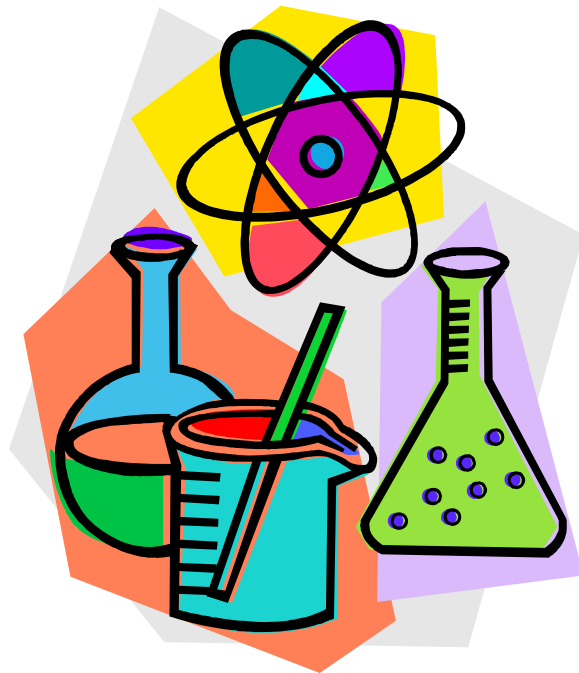
Amostras quantificadas em espectrofotômetro, que acusarem ausência de DNA, eventualmente, podem conter concentrações mínimas ou a presença de muitos contaminantes que interferem no processo de leitura do DNA. Caso haja dúvida, pode-se fazer um gel de agarose, aplicando uma quantidade maior da amostra (cerca de 10 $\mu$ l) e se certificar que de fato as amostras não contêm DNA.

## 5. Acondicionamento das amostras de DNA

Após realizada a quantificação do DNA, deve-se procurar fazer dois diferentes tipos de alíquotas do material. Uma primeira alíquota de DNA, de volume suficiente, deve ser mantida para uso rotineiro em laboratório e uma segunda alíquota, de maior volume, deve ser reservada e estocada em um Banco de DNA. Este procedimento garante que parte do DNA estocado não seja degradada durante os processos de descongelamento e congelamento, usuais na realização dos experimentos em laboratório.

Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado que o genoma de camarões peneídeos parece apresentar uma quantidade maior da enzima DNase que o genoma de outros organismos. Esta característica facilita o processo de degradação do DNA mais rapidamente. Por isso é importante requantificar o material sempre que se achar conveniente. O tecido também deve permanecer muito bem conservado para que o DNA se mantenha o mais íntegro possível até o momento da extração. Amostras de tecido muito antigas podem não oferecer DNA de alta qualidade.

## CAPÍTULO IV



### Amplificação Do DNA

## 6. Reações De Amplificação De DNA

Após extraído e devidamente quantificado, o DNA está pronto para ser utilizado em diferentes procedimentos da Biologia Molecular, incluindo reações de amplificação e construção de bibliotecas genômicas.

A amplificação de DNA via PCR se dá através da utilização de uma mistura de reagentes necessários para sintetizar novos segmentos da molécula. Um ciclo de reação, estabelecido em aparelho termociclador, no qual variam os tempos e as temperaturas, simula 'in vitro' os fenômenos que ocorrem naturalmente nas células vivas durante o processo de replicação de DNA.

Um padrão de amplificação adequado deve ser obtido para cada reação em particular. As condições da reação são imprescindíveis para garantir resultados confiáveis. Deve-se fazer inúmeras variações nas concentrações dos reagentes e ciclos de reação até que se obtenha um padrão de amplificação altamente satisfatório.

Cada reação deve utilizar quantidades suficientes de Cloreto de Magnésio ( $MgCl_2$ ), dinucleotídeos (dNTPs: Adenina, Guanina, Citosina e Timina), enzima DNA Polimerase, oligonucleotídeos iniciadores (primers) e amostras do DNA *template*. Adicionalmente deve-se ainda fazer uso de alguns componentes tamponantes e estabilizadores da reação. A composição dos tampões, em geral, inclui Tris-HCl, KCl e gelatina. Em geral costuma-se utilizar cerca de 1/10 de tampão (10x) por volume final de reação.



Todos estes fatores influenciam no sucesso da amplificação, podendo ser adequados a diferentes situações, visando-se a otimização e o aumento da especificidade da reação de PCR

A enzima *Taq* Polimerase, isolada do microorganismo *Thermus aquaticus*, resiste a altas temperaturas, sendo a mais comumente utilizada em reações de PCR. Concentrações de *Taq* muito altas podem resultar na amplificação de regiões inespecíficas. Para seqüências mais complexas, no entanto, concentrações maiores são necessárias.

Um dos componentes essenciais para que a DNA Polimerase atue é o magnésio. Em geral, costuma-se utilizar tampões que possuem em sua composição o  $MgCl_2$ . Entretanto quantidades complementares podem ser adicionadas à reação. A concentração de  $MgCl_2$  pode ter um efeito significativo na especificidade da reação. Concentrações próximas a 1,5mM, são geralmente adequadas. Entretanto, muitas vezes, são necessários ajustes.

O excesso de  $MgCl_2$  pode resultar na acumulação de produtos de amplificação não específicos. Por outro lado, concentrações insuficientes podem impossibilitar a amplificação de DNA. É necessário que haja magnésio disponível para que os dinucleotídeos possam ser adicionados pela *Taq* à nova fita que estará se formando.

A quantidade de dNTP na reação determinará a quantidade de magnésio livre. Concentrações de dNTP muito altas também podem facilitar ou promover incorporações errôneas pela enzima *Taq* Polimerase. Em geral, costuma-se utilizar cerca 200  $\mu$ M de dNTP por reação.

Outro importante fator para o sucesso da amplificação de DNA via PCR está relacionado com as características dos primers utilizados. Em RAPD, por exemplo, os oligonucleotídeos costumam ser decâmeros e ter um mínimo de 50% de conteúdo de GC em sua composição. Primers flanqueadores de microssatélites, no entanto, costumam ser maiores e apresentar de 15 a 20 nucleotídeos em sua seqüência.

A concentração de primer encontra-se intimamente relacionada com a temperatura em que se dará o anelamento do mesmo com a região complementar. Quantidades próximas a 25pmoles são suficientes em reações de RAPD. Entretanto, para se determinar a temperatura de hibridação ou annealing deve-se levar em consideração as características de cada primer utilizado. O primer se hibridará à região alvo através da diminuição da temperatura de desnaturação.

Para oligonucleotídeos de 15 bases costuma-se utilizar temperaturas que variam entre 40 e 50°C. Para primers com 20 bases temperaturas superiores são mais indicadas. Primers menores, como os de RAPD, necessitam, em geral, de temperaturas mais baixas, variando em torno de 35°C. Temperaturas muito baixas, no entanto, podem promover ligações inespecíficas, resultando em padrões de amplificação inadequados.

O tempo de duração e a determinação de uma dada temperatura são responsáveis por uma etapa determinante no processo de amplificação do DNA. Uma etapa inicial garante que todo o DNA fita dupla seja previamente desnaturado. O aquecimento insuficiente durante o primeiro passo de desnaturação costuma ser uma falha nas reações de PCR. Este passo é extremamente importante e uma temperatura de 94°C é adequada para maioria dos casos.

Posteriormente, iniciam-se os ciclos de reações caracterizados pelas etapas de desnaturação, ligação ou hibridação do oligonucleotídeo à região de DNA complementar e, finalmente, replicação dos segmentos específicos da molécula. Após um determinado número de repetições (que pode variar entre 35 a 50 vezes), são produzidas inúmeras cópias de uma região de DNA, flanqueada pela seqüência dos oligonucleotídeos utilizados, cujo número é definido por  $2^n$ , onde n é o número total de ciclos. Ao final do último ciclo, a temperatura de extensão deve permanecer por um tempo relativamente maior para que o processo de extensão de regiões que estavam sendo amplificadas possa ser finalizado.

O DNA também pode se constituir num fator limitante da reação, sendo considerado por alguns autores como um dos parâmetros mais críticos da PCR. Dependendo da quantidade de contaminantes (restos de proteínas, RNA, polissacarídeos, fenol) nas amostras, a amplificação pode não ocorrer.

Como mencionado no item relativo à extração de DNA, a diminuição nas concentrações de DNA pode facilitar o processo de amplificação, caso haja a presença de muitos contaminantes. Em geral concentrações entre 10 e 100ng produzem resultados satisfatórios. Pode-se também testar alíquotas que possuam concentrações menores. Ensaios realizados em amostras contendo fenol demonstraram que, em alguns casos, quantidades de DNA variando em torno de 5 a 6ng produziram padrão de amplificação satisfatório.

### **6.1. Reações de Amplificação de DNA utilizando primers de RAPD**

Após inúmeros testes realizados com diferentes protocolos para amplificar DNA utilizando oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias, chegamos a conclusão que para o DNA de camarão a melhor opção consiste em fazer uso de Kits específicos para PCR, que minimizem os efeitos de componentes que possam inibir a ação da taq e impedir o processo de amplificação do DNA.

Em nosso laboratório adotamos o kit *Ready-To-Go RAPD Analysis Bead* (Amersham Pharmacia), especialmente desenvolvido para reações de RAPD. Este Kit é composto por 100 reações individuais que se apresentam sob a forma de esferas liofilizadas, denominadas *beads*, contidas em tubos de 0,5 µl. Cada *bead* é composto por enzimas DNA Polimerase termoestáveis (*AmpliTaq™ DNA Polymerase* e *Stoffel Fragment*), 0,4mM de cada dNTP, 2,5µg de BSA (*Bovine Serum Albumine*), 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 30mM de KCl e 10mM Tris (pH 8,3).

Para sua utilização, são necessários apenas ajustes em relação ao ciclo de reação e às concentrações dos primers e das amostras de DNA que serão amplificadas. Com este kit pode-se testar diferentes oligonucleotídeos de seqüências arbitrárias e posteriormente selecionar apenas aqueles que apresentarem os melhores perfis de amplificação.

Um perfil de reação padrão pode direcionar os testes iniciais, partindo-se de um volume final de reação de 25  $\mu$ l, contendo cerca de 50 ng de DNA e 25 pmoles de primer. Para esta reação, deve-se adicionar ao tubo 19  $\mu$ l de água milliQ, 5  $\mu$ l de primer (em estoque a 5 pmol/ $\mu$ l) e 1  $\mu$ l de DNA, na concentração previamente estabelecida. Os microtubos devem ser delicadamente homogeneizados, centrifugados por 2 segundos em microcentrifuga a 1000 rpm e imediatamente transferidos para o termociclador, iniciando o processo de amplificação.

Para reações de RAPD-PCR deve-se procurar utilizar sempre um mesmo termociclador, visando-se minimizar possíveis diferenças entre os padrões de amplificação obtidos, decorrentes de diferenças entre os aparelhos utilizados.

Durante a adição dos reagentes os microtubos devem ser mantidos a uma temperatura de -4°C, sendo o DNA o último componente a ser adicionado. Desta forma, evita-se, respectivamente, possíveis perdas de atividade dos reagentes e/ou contaminações no material.

Terminada a reação, os microtubos devem ser retirados do termociclador e mantidos a uma temperatura de -20°C, para posterior visualização dos produtos em gel de agarose.

Sugestão de primers de RAPD para serem utilizados em camarão

Oligonucleotídeos	Seqüência
1 ( <i>Amersham Pharmacia</i> )	5' - GGT GCG GGAA - 3'
2 ( <i>Amersham Pharmacia</i> )	5' - GTT TCG CTCC - 3'
3 ( <i>Amersham Pharmacia</i> )	5' - GTA GAC CCGT - 3'
4 ( <i>Amersham Pharmacia</i> )	5' - AAG AGC CCGT - 3'
5 ( <i>Amersham Pharmacia</i> )	5' - AAC GCG CAAC - 3'
6 ( <i>Amersham Pharmacia</i> )	5' - CCC GTC AGCA - 3'
A9 ( <i>Garcia et al., 1994</i> )	5' - GGG TAA CGCC - 3'
A10 ( <i>Garcia et al., 1994</i> )	5' - GTG ATC GCAG - 3'
A20 ( <i>Garcia et al., 1994</i> )	5' - GTT GCG ATCC - 3'
B11 ( <i>Garcia et al., 1994</i> )	5' - GTA GAC CCGT - 3'
B14 ( <i>Garcia et al., 1994</i> )	5' - TCC GCT CTGG - 3'
B20 ( <i>Garcia et al., 1994</i> )	5' - GGA CCC TTAC - 3'
101 ( <i>Tassanakajon et al., 1997</i> )	5' - GCG CCT GGAG - 3'
174 ( <i>Tassanakajon et al., 1997</i> )	5' - AAC GGG CAGG - 3'
428 ( <i>Tassanakajon et al., 1997</i> )	5' - GGC TGC GGTA - 3'
456 ( <i>Tassanakajon et al., 1997</i> )	5' - GCG GAG GTCC - 3'
457 ( <i>Tassanakajon et al., 1997</i> )	5' - CGA CGC CCTG - 3'
459 ( <i>Tassanakajon et al., 1997</i> )	5' - GCG TCG AGGG - 3'
B-07 ( <i>Gibco BRL</i> )	5' - GTG AGG CGT C - 3'
B-09 ( <i>Gibco BRL</i> )	5' - CCC GCT ACA C - 3'
C-05 ( <i>Gibco BRL</i> )	5' - GTG GGC TGA C - 3'
C-10 ( <i>Gibco BRL</i> )	5' - GCG CCT GGA G - 3'
D-02 ( <i>Gibco BRL</i> )	5' - CGA CGC CCT G - 3'
D-03 ( <i>Gibco BRL</i> )	5' - GCC TCG AGG G - 3'

---

OPA-02 (Operon Technologies)	5' - TGC CGA GCT G - 3'
OPA-03 (Operon Technologies)	5' - AGT CAG CCA C - 3'
OPA-04 (Operon Technologies)	5' - AAT CGG GCT G - 3'
OPA-05 (Operon Technologies)	5' - AGG GGT CTT G - 3'
OPA-06 (Operon Technologies)	5' - GGT CCC TGA C - 3'
OPA-07 (Operon Technologies)	5' - GAA ACG GGT G - 3'
OPA-08 (Operon Technologies)	5' - GTG ACG TAG G - 3'
OPA-09 (Operon Technologies)	5' - GGG TAA CGC C - 3'
OPA-10 (Operon Technologies)	5' - GTG ATC GCA G - 3'
OPA-11 (Operon Technologies)	5' - CAA TCG CCG T - 3'
OPA-12 (Operon Technologies)	5' - TCG GCG ATA G - 3'
OPA-13 (Operon Technologies)	5' - CAG CAC CCA C - 3'
OPA-14 (Operon Technologies)	5' - TCT GTG CTG G - 3'
OPA-15 (Operon Technologies)	5' - TTC CGA ACC C - 3'
OPA-16 (Operon Technologies)	5' - AGC CAG CGA A - 3'
OPA-17 (Operon Technologies)	5' - GAC CGC TTG T - 3'
OPA-18 (Operon Technologies)	5' - AGG TGA CCG T - 3'
OPA-19 (Operon Technologies)	5' - CAA ACG TCG G - 3'
OPA-20 (Operon Technologies)	5' - GTT GCG ATC C - 3'
OPP-01 (Operon Technologies)	5' - GTA GCA CTCC - 3'
OPP-02 (Operon Technologies)	5' - TCG GCA CGCA - 3'
OPP-03 (Operon Technologies)	5' - CTG ATA CGCC - 3'
OPP-04 (Operon Technologies)	5' - GTG TCT CAGG - 3'
OPP-05 (Operon Technologies)	5' - CCC CGG TAAC - 3'
OPP-06 (Operon Technologies)	5' - GTG GGC TGAC - 3'
OPP-07 (Operon Technologies)	5' - GTC CAT GCCA - 3'
OPP-08 (Operon Technologies)	5' - ACA TCG CCCA - 3'
OPP-09 (Operon Technologies)	5' - GTG GTC CGCA - 3'
OPP-10 (Operon Technologies)	5' - TCC CGC CTAC - 3'
OPP-11 (Operon Technologies)	5' - AAC GCG TCGG - 3'
OPP-12 (Operon Technologies)	5' - AAG GGC GAGT - 3'
OPP-13 (Operon Technologies)	5' - GGA GTG CCTC - 3'
OPP-14 (Operon Technologies)	5' - CCA GCC GAAC - 3'
OPP-15 (Operon Technologies)	5' - GGA AGC CAAC - 3'
OPP-16 (Operon Technologies)	5' - CCA AGC TGCC - 3'
OPP-17 (Operon Technologies)	5' - TGA CCC GCCT - 3'
OPP-18 (Operon Technologies)	5' - GGC TTG GCCT - 3'
OPP-19 (Operon Technologies)	5' - GGG AAG GACA - 3'
OPP-20 (Operon Technologies)	5' - GAC CCT AGTC - 3'

---

Sugestão de ciclo de RAPD para amplificação de DNA: 4 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 92°C; 1,5 minuto a 37°C e 2 minutos a 72°C, com extensão final de 3 minutos a 72°C.

### **6.1.1. Análise eletroforética dos fragmentos amplificados**

A análise eletroforética dos fragmentos amplificados pode ser realizada em gel de agarose 1,5%, imerso em TBE (1x), submetido a uma condição de corrida de 100 volts por 3 horas.

O procedimento utilizado na preparação dos géis de agarose para visualização dos produtos de RAPD é similar ao descrito para quantificação de DNA. Alterações na concentração do gel devem ser feitas. Um marcador de peso molecular (1kb-Invitrogen) também deve ser aplicado para estimar o provável tamanho dos fragmentos amplificados.

É importante destacar, porém, que antes do estabelecimento das condições ideais para análise eletroforética dos produtos amplificados deve-se testar variações na concentração do gel, na voltagem e no tempo de corrida para cada padrão de bandas obtido.

Concentrações iniciais próximas a 1% são mais indicadas para fragmentos com pesos moleculares bem diferenciados, que se separam facilmente em concentrações menores. Para perfis de amplificação contendo fragmentos com tamanhos muito próximos, deve-se, no entanto, aumentar a



concentração do gel, visando-se separar as bandas de maneira que estas possam ser bem visualizadas e definidas.

Quanto maior a concentração do gel, maior será o seu poder de resolução. Concentrações mais altas possibilitam uma distinção melhor entre os fragmentos obtidos, entretanto, necessitam de um maior tempo de corrida, principalmente, se estes fragmentos possuem pesos moleculares muito próximos. O prolongamento demasiado no tempo de corrida pode diminuir a nitidez da imagem visualizada em transiluminador, devido à dispersão da amostra de DNA no gel de agarose. Por tanto deve-se estabelecer um padrão eletroforético adequado que permita a identificação dos fragmentos, mas não interfira na qualidade do gel produzido.

A voltagem utilizada também não deve ser muito alta para que não ocorram distorções na imagem formada. Uma vez padronizadas as condições de corrida, tal procedimento deve ser fidedignamente reproduzido para que o perfil de bandas obtido para as diferentes amostras analisadas possa ser corretamente interpretado.

Todas as imagens analisadas devem ser registradas através da utilização de um sistema de fotodocumentação que pode ser o sistema de imagem *Kodak Digital Science™ EDAS 290*, desenvolvido para análise e documentação de géis de eletroforese, ou um sistema polaróide de captura de imagens emitidas sob luz UV. Ambos devem ser utilizados seguindo-se as instruções do fabricante.

### 6.1.2. Escolha das Amostras para realização das Análises Estatísticas

Somente os produtos amplificados que apresentarem alta reprodutibilidade devem ser selecionados para as análises estatísticas multilocus. Cada fragmento obtido deve ser nomeados e os pesos moleculares aproximados determinados.

Pode-se fazer uso de uma régua para auxiliar na identificação e análise das bandas nas diferentes amostras estudadas. Matrizes binárias, baseadas na presença (1) ou ausência (0) de cada fragmento, devem ser construídas e submetidas a uma análise estatística descritiva para dados diplóides com comportamento dominante.

Para padrões multilocus costuma-se calcular as percentagens de locos polimórficos, as frequências gênicas (Nei, 1987), coeficiente de similaridade genética de Jaccard (1901) os índices de diversidade (Nei, 1973), distância (Nei, 1972) e identidade (Nei, 1978) genéticas e estabelecer dendogramas de similaridade genética baseados no método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) (Sneath e Sokal, 1973).

O coeficiente de similaridade genética de Jaccard, comumente utilizado no passado para estimar os níveis de diversidade de espécie em duas ou mais populações, atualmente, vem sendo extremamente aplicado para estimativas de variabilidade genética em populações analisadas através de marcadores moleculares com comportamento dominante, uma vez que não

considera discordâncias como indicativo de similaridade genética. Ele pode ser expresso através da fórmula:  $S_J = a / a + b + c$ , onde  $a$  corresponde ao número total de bandas coincidentes em dois indivíduos  $x$  e  $y$ ,  $b$  ao número total de bandas exclusivas em um indivíduo  $x$  e  $c$  ao número total de bandas presentes em  $y$  e ausentes em  $x$ .

As freqüências alélicas ( $q$ ), comumente determinadas através da fórmula:  $q_{x_a x_a} = N_{aa}/N$  e  $q_{y_a y_b} = \sum N_{ab}/N$ , com  $a \neq b$ , onde  $N$  é o número total de indivíduos analisados,  $N_{aa}$  é o número de indivíduos com genótipo homozigoto  $x_a x_a$  e  $N_{ab}$  é o número de indivíduos com genótipo heterozigoto  $y_a y_b$ , para dados dominantes deve considerar o número de indivíduos que não apresentam o fragmento para um determinado loco e o número total de indivíduos analisados.

A diversidade genética ( $h$ ) estima a variabilidade genética com base na freqüência esperada de indivíduos heterozigotos e no número de alelos que são mantidos para cada loco considerado. Ela reflete o polimorfismo de uma população, podendo ser expressa através da fórmula:  $h_n = \sum N_{ab}$ , com  $a \neq b$ ,  $N_{ab}$  igual à freqüência de indivíduos heterozigotos observados na população e  $n$  igual ao loco considerado.

A percentagem de locos polimórficos ( $f$ ) é dada a partir do número de locos observados que se apresenta diferenciado entre si e é expressa por:  $f = p/m$ , onde  $p$  é o número total de locos polimórficos e  $m$  é o número total de locos analisados. Ela também reflete o grau de polimorfismo de uma população, sendo comumente utilizada para estimar os níveis de diversidade genética

em estudos que consideram a análise de marcadores com comportamento dominante.

Os valores de distância ( $D$ ) e identidade ( $I$ ) genética refletem, respectivamente, o grau de diferenciação e de proximidade genética entre diferentes indivíduos ou populações. Em geral, costuma-se considerar a Identidade como sendo:  $I=1-D$ , com  $D= -\ln (q_{1-2}/\sqrt{q_1 \cdot q_2})$ , onde  $q_1$  e  $q_2$  são, respectivamente, a homoziguidade nas populações 1 e 2 para todos os locos analisados e  $q_{1-2}$  a homoziguidade média determinada para as duas populações.

É importante lembrar, que por se tratar de polimorfismos de RAPD, os programas computacionais utilizados devem ser apropriados para este tipo análise.

#### **SOFTWARE SUGERIDOS:**

NTSYS, versão 1.80 (Rohlf, 1993).

Popgene, versão 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

BioEstat 2.0 (Ayres *et al.*, 2000).

Todos os programas estatísticos utilizados devem seguir os procedimentos básicos de utilização contidos nos seus respectivos manuais de instrução.