



<http://dx.doi.org/10.12702/VIII.SimposFloresta.2014.90-588-1>

Análise comparativa do uso dos primers oligo (dT) e random na síntese de cDNA a partir de amostras de mRNA

Viviane F. Anjos¹, Ariadne Marques¹, Inaê M. A. Silva², Any C. P. Rodrigues¹, Janaína F. Gonçalves¹, Marcelo L. de Laia¹

¹Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (vivis.anjus@gmail.com; ariadne.marqs@hotmail.com; anycarol_rd@hotmail.com; gonferja@yahoo.com.br; marcelolaia@gmail.com); ²Universidade de Brasília (inaemarie@hotmail.com)

Resumo: *A análise da expressão gênica é de grande importância para os estudos dos processos fisiológicos e metabólicos de indivíduos sob condições de estresse. Nesse processo a obtenção de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA mensageiro (mRNA) mediante a atividade da enzima transcriptase reversa (RT) é uma peça fundamental. No entanto as características do cDNA podem sofrer alterações dependendo da maneira como a reação de transcrição é preparada. Nesse sentido, o presente estudo buscou verificar qual dos dois primers mais utilizados no processo de transcrição, Oligo (dT) ou Random fornecem melhores resultados. Para tanto foram realizados dois processos de transcrição a partir de duas amostras de RNA total, tratadas com a enzima DNase I e purificadas com fenol pH ácido, utilizando cada um dos primers. Análises por eletroforese em gel de agarose para as duas amostras após a síntese do cDNA possibilitaram a visualização de rastros e bandas indicando o sucesso do processo. Os resultados demonstraram que ambos os primers, dentro de suas especificidades, foram eficientes no processo de síntese do cDNA fita dupla. Permitindo inferir que a escolha do primer dependerá das especificidades do processo no qual o cDNA obtido será subsequentemente utilizado.*

Palavras chave: biotecnologia; expressão gênica; estresse; transcriptase reversa.

1. Introdução

Mudanças abruptas e periódicas nas condições ideais de sobrevivência ao longo da vida de um indivíduo podem provocar alterações quanto a expressão gênica, interferindo nos processos fisiológicos e metabólicos naturais. Levando à produção de metabólitos secundários e à expressão de características não

herdáveis que, provavelmente, somente poderão ser identificadas por meio da análise da expressão gênica global no momento do estresse (SILVA et al., 2010).

Dentre as diversas técnicas de biotecnologia disponíveis para a análise da expressão gênica global tem-se as bibliotecas de cDNA obtidas por meio de hibridação subtrativa supressiva (SSH) (DIATCHENKO et al., 1996; AKOPYATS et al., 1998). Estas bibliotecas permitem identificar genes que estão sendo expressos somente em um dado genótipo ou em uma dada condição, comparando a outro. Dependendo da quantidade de genes identificados por tal técnica, o próximo passo é validá-los em um sistema modelo, que permitirá determinar a funcionalidade destes genes (DABBAS et al., 2006; CARVALHO et al., 2011).

A base para que esse processo seja efetivado é a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir de amostras de RNA total ou de RNA mensageiro, utilizando, para tanto, a atividade transferase terminal da enzima transcriptase reversa (RT). Dentre os reagentes necessários nesse processo tem-se o oligonucleotídeo, sendo os dois mais usados o Oligo (dT) e o Random.

Uma vez que, as características da biblioteca sofrem alterações dependendo da maneira como a reação de transcrição é preparada. O presente estudo teve por objetivo verificar qual dos dois primers fornecem melhores resultados no processo de síntese do cDNA.

2. Material e Métodos

O estudo foi realizado a partir de duas amostras contraste (Amostra 1 e Amostra 2) de RNA total, previamente extraídas com o auxílio do conjunto de reagentes PureLink Plant RNA Reagent, conforme as recomendações do fabricante (Life Technologies). Tratadas com a enzima DNase I para eliminar o DNA genômico presente nas amostras, seguido de uma purificação com fenol pH ácido.

Ao final desses processos uma alíquota 4 µL de RNA tratado e purificado de cada amostra foi utilizada no processo de síntese do cDNA fita simples. Comparativamente, foram preparadas duas reações de transcrição para cada amostra, uma utilizando 1 µL Oligo (dT) e a outra 1 µL de Random primer. Subsequentemente as amostras foram utilizadas no processo de síntese do cDNA fita dupla mediante ação da polimerase. Terminado cada processo de síntese

(primeira e segunda fitas) uma alíquota de 5 μ L de cada amostra foi reservada para análise por eletroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), em tampão TAE 1x (Tris-Acetato-EDTA), em cuba horizontal, corado com 2 μ L brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

3. Resultados e Discussão

O tratamento com a enzima DNase I e posterior purificação com fenol pH4,3 foram satisfatórios (Figura 1). Eliminando todo o DNA gnômico e possibilitando iniciar a síntese da primeira fita de cDNA.

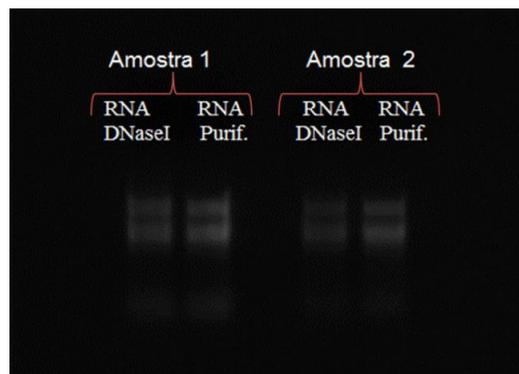


FIGURA 1 - Imagem do gel de agarose (0,8%), visualizado sob luz ultravioleta, mostrando a presença, apenas, das bandas de rRNA, após o tratamento com a enzima DNase I; bandas de rRNA após a purificação com o fenol pH4,3, para as amostras 1 e 2, respectivamente.

Análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 2) para as duas amostras após a síntese do cDNA fita simples possibilitaram a visualização de rastros e bandas indicando o sucesso do processo e possibilitando dar continuidade ao procedimento. Para o processo de síntese do cDNA fita dupla, embora, os rastros observados para as amostras tenham sido bem mais claros que os observados após a síntese da primeira fita, as amostras obtidas ao final desse processo podem ser utilizadas em etapas subsequentes do processo de obtenção da biblioteca de cDNA, bem como em outros processos de análise da expressão gênica.

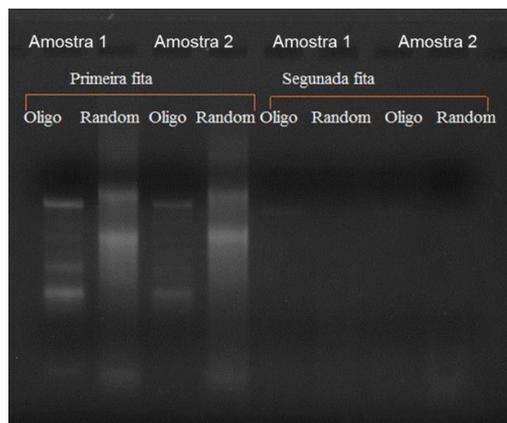


FIGURA 2 - Imagem do gel de agarose (0,8%), visualizado sob luz ultravioleta, mostrando a presença de rastros e algumas bandas nítidas após a síntese da primeira fita de cDNA; e, bem mais claros após a síntese da segunda fita de cDNA. Para as amostras 1 e 2, respectivamente. Utilizando-se o Oligo dT e o Random primer no processo de síntese.

Os resultados permitiram inferir que os dois oligonucleotídeos utilizados possibilitaram resultados semelhantes ao final do processo de transcrição com a enzima transcriptase reversa.

O uso do Oligo (dT) na síntese de cDNA pode levar a representação de apenas alguns e o uso do Random, por sua vez, é usado na tentativa de abranger uma maior representação dos transcritos ao longo de seus comprimentos inteiros (MORTAZAVI et al., 2008). Isso pode estar relacionado, dentre outros, ao fato do Oligo dT diferentemente do Random que amplifica todos os RNAs, amplifica apenas fragmentos de RNAm. O que explica a menor dimensão do rastro por ele produzido na análise por eletroforese.

4. Conclusão

Os dois oligonucleotídeos são eficientes no processo de síntese do cDNA fita dupla. A escolha de qual primer utilizar dependerá das especificidades do processo no qual o cDNA obtido será subsequentemente utilizado.

5. Referências

AKOPYANTS, N.S. et al. Pcr-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori*. **PNAS**, v. 95, n.22, p. 13108-13113, 1998. <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.22.13108>>.

CARVALHO et al. Biblioteca subtrativa de raízes de soja em resposta à inoculação de *Bradyrhizobium japonicum*. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, Londrina-PR, v.1, n.1, p.3-8, 2012. <<http://dx.doi.org/10.5433/2316-5200.2012v1n1p3>>.

DABBAS, K. M. et al. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaudadura da folha. **Summa Phytopathologica**,

Botucatu-SP, v. 32, n. 4, p. 328-338, 2006. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-54052006000400003>>.

DIATCHENKO, L. et al. Supression subtractive hybridization a method for generating differentially regulated or tissue-specific cdna probes and libraries. **PNAS**, v. 93, n 12, p. 6025-6030, 1996. <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.93.12.6025>>.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v.5, p.621–628, 2008. <<http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1226>>.

SILVA, S.R. et al. Distúrbios fisiológicos ocasionados pelo estresse hídrico em clones de eucalipto na Veracel: estudo de caso e hipóteses. In: WORKSHOP EM MELHORAMENTO FLORESTAL, 6.; REUNIÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA DO PTSM, 41.: Adaptação genotípica ao estresse hídrico e térmico, 2010, Botucatu-SP. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, 2010. Disponível em:<http://www.ipef.br/eventos/2010/melhoramento_e_manejo/sergio_veracel.pdf>. Acesso em: 21 jul. 2014.