
**MENORES CONCENTRAÇÕES DE FITAS MOLDES DE DNA GENÔMICO EXTRAÍDAS
A PARTIR DE MICROBIOTA RUMINAL AUMENTAM A EFICIÊNCIA DAS
AMPLIFICAÇÕES IN VITRO**

**LOWER CONCENTRATIONS OF TEMPLATES OF GENOMIC DNA ISOLATED FROM
RUMINAL MICROBIOTA IMPROVE EFFICIENCY OF IN VITRO AMPLIFICATIONS**

**Kárita Cláudia FREITAS-LIDANI¹; Daniela Scherner FERREIRA²; Humberto Maciel
França MADEIRA³; Jane Eyre GABRIEL⁴**

1 - Pós-doutoranda da Universidade Federal do Paraná UFPR, Curitiba, PR

2 - Graduanda da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR, São José dos Pinhais, PR

3 - Professor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná PUCPR, São José dos Pinhais, PR

4 - Professora da Universidade Federal do Vale do São Francisco UNIVASF, Petrolina, PE.

Autor de correspondência: jane.gabriel@univasf.edu.br

RESUMO:

O presente estudo teve como objetivo maximizar a amplificação *in vitro* de amostras de DNA genômico extraídas a partir de micro-organismos típicos da microbiota ruminal. Diferentes concentrações de amostras de DNA genômico isoladas a partir líquido ruminal foram empregadas como fitas moldes em reações de amplificação na presença de iniciadores específicos para o gene do RNA ribossomal 16S. Um produto amplificado de aproximadamente 500pb foi visualizado em eletroforese em géis de agarose. Baixa eficiência de amplificação com a presença de produtos não-específicos de amplificação foi verificada nas PCRs realizadas na presença de DNA genômico variando de 19,2 a 40ng. Produtos de amplificação foram exclusivamente detectados com maior intensidade e alta especificidade nas amostras de DNA genômico contendo as menores quantidades de fita-molde de 0,8 a 1,6ng. Ausência de sinal de amplificação foi verificada nas reações de PCRs contendo maiores quantidades de DNA genômico variando de 98 a 200ng. Assim, amostras de DNA mais concentradas demonstraram baixa eficiência e especificidade de amplificação em comparação às amostras menos concentradas de fitas moldes. Desta forma, os resultados descritos nesse estudo evidenciam que concentrações de DNA inferiores às quantidades geralmente recomendadas nos protocolos convencionais produziram amplicon com alta especificidade nas reações de amplificação, empregando como fitas moldes DNA genômico isolado a partir de microbiota ruminal. As descobertas descritas nesse estudo apresentam uma estratégia acessível para amplificar *in vitro* fragmentos de DNAs genômicos ruminais provenientes de complexas comunidades microbianas.

Palavras-chave: amplificação *in vitro*, comunidade microbiana ruminal, eficiência de PCR.

ABSTRACT:

The current study aimed to maximize the amplification of templates of genomic DNA isolated from microorganisms typical of rumen microflora. Samples of genomic DNA were submitted to serial dilutions, followed by amplification in the presence of specific primers for the 16S ribosomal RNA gene. A 500bp amplicon was visualized into agarose gels to verify the efficiency and specificity of *in vitro* amplification reactions. Lower efficiency and detection of non-specific amplicons were demonstrated in the reactions containing templates of genomic DNA ranging of 19.2 to 40.0ng. Higher intensity and specificity of the amplification product

were exclusively detected in the presence of genomic DNA ranging of 0.8 to 1.6ng. No amplification was revealed in PCRs containing higher amounts of genomic DNA ranging of 98 to 200ng. Thus, higher concentrations of genomic DNA templates showed weak specificity and efficiency in the amplification reactions compared to amplifications using concentrated genomic DNA templates. These results evidenced that higher specificity of amplicon of interest was showed in the amplification reactions using lower genomic DNA template isolated from ruminal fluid than the amounts generally described in conventional procedure. The findings described in current study reveal an accessible strategy to improve efficiency of *in vitro* amplifications using genomic DNA isolated from complex microbial communities.

Keywords: amplification *in vitro*, rumen microbial community, PCR efficiency.

1. INTRODUÇÃO

O rúmen ou pança, primeiro compartimento do estômago de animais ruminantes, funciona como um ecossistema com alta complexidade, abrigando uma variedade de micro-organismos muito eficientes na digestão da matéria vegetal pela produção de enzimas que permitem ao ruminante aproveitar com maior eficiência alimentos fibrosos presentes na dieta (BORDIM et al., 2016). Nas últimas décadas, esforços vêm sendo dispendidos para investigar em detalhes a natureza e a dinâmica biológica dos micro-organismos constituintes da microbiota ruminal. Sob esse contexto, análises moleculares baseadas nas reações de amplificação de DNA genômico isolado a partir dessa complexa comunidade microbiana vêm sendo frequentemente requeridas nos estudos de caracterização molecular de microbiota do trato digestório de ruminantes (FREITAS et al., 2008).

A eficácia das reações de amplificação *in vitro* (PCR) é diretamente mensurada por sua especificidade, eficiência de produção e fidelidade, ou seja, uma PCR altamente específica deve gerar em poucos ciclos apenas um único produto de amplificação a partir de uma sequência alvo desejada. Infelizmente, várias limitações têm afetado os estudos de caracterização molecular da população microbiana ruminal, com particular ênfase a baixa produção de DNA genômico e a presença de substâncias inibitórias, tais como taninos, polissacarídeos, proteínas, gorduras, capazes de impedir a amplificação de fragmentos de DNAs de interesse em reações enzimáticas de amplificação *in vitro* (MOREIRA, 2001, SHARMA et al., 2003, YU & MORRISON, 2004). Especialmente nesse caso, o emprego de colunas purificadoras com resinas é requerido para minimizar a ação de tais inibidores durante as PCRs, o que torna o processo oneroso e pouco acessível em muitos casos.

Sob esse aspecto, visando uma melhor compreensão do papel biológico da flora microbiana para a nutrição e a saúde de ruminantes torna-se relevante o desenvolvimento de estratégias metodológicas alternativas para maximizar as reações de amplificação *in*

vitro de DNA genômico isolado de comunidades complexas de microbiota ruminal, um ambiente naturalmente caracterizado por acentuada presença de componentes inibitórios, eliminando os custos adicionais com o emprego de colunas purificadoras de resinas. Nesse cenário, o presente estudo objetivou estimar como diferentes quantidades de fitas moldes de DNA genômico isoladas de microbiota ruminal podem afetar a eficiência de reações de amplificação *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises moleculares aproximadamente 100mg de conteúdo ruminal foram colhidos a partir da mediana-ventral do rúmen de uma vaca holandesa fistulada. A extração de DNA genômico da microbiota proveniente de conteúdo ruminal foi realizada a partir do protocolo originalmente proposto por KRAUSE et al. (2001). Tal protocolo experimental envolve uma etapa inicial de lise celular em homogeneizador do tipo “beadbeater” (Biospec Products) na presença de esferas de zircônia com 100µm de diâmetro, seguido pela incubação em solução aquosa contendo polietilenoglicol PEG 35% (% Peso/Volume), especialmente empregado para gerar amostras de DNA livres de inibidores, tais como: taninos e outros compostos fenólicos, naturalmente encontrados nesse ambiente. Após lavagem em solução contendo mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (v/v/v) e precipitação do DNA genômico em igual volume de álcool isopropílico, os precipitados de DNA foram lavados em álcool etílico 70% e secos a temperatura ambiente. A concentração das amostras de DNA genômico foi estimada por leituras ao espectrofotômetro (Itachi D2000) com valores variando de 48 a 100ng/uL e grau de pureza superiores a 1,6. A visualização da integridade das amostras de DNA genômico em géis de agarose 0,8% demonstrou a presença de múltiplos fragmentos de tamanhos variáveis ao longo de sua migração. O DNA genômico com este aspecto é típico quando os protocolos de extração utilizam o homogeneizador do tipo “beadbeater” durante as etapas de lise celular.

Para realizar as reações de amplificação, amostras de DNA genômico foram submetidas a sucessivas diluições seriadas em água ultrapura estéril em fatores de diluição correspondentes a 5X com concentrações de DNA variando de 9,6 a 20ng/uL; 25X com concentrações de DNA variando de aproximadamente 2,0 a 4,0ng/uL; e 125X com concentrações de DNA variando de 0,4 a 0,8ng/uL. Em tais condições experimentais foram utilizados os iniciadores universais bacterianos BA338fGC (5’-

GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGACTCCTACGGGAGGCAGCA G-3') e UN518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') específicos para amplificar sequências gênicas que codificam o RNA ribossomal 16S (RNAr 16S). As PCRs foram realizadas em um volume final de 25µL contendo 2,5mL de tampão PCR (20mM Tris-HCl pH 8,4; 50mM KCl), 3mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 1mM de cada iniciador, 1 unidade de Taq DNA polimerase (Invitrogen, EUA) na presença de um volume fixo de 2µL contendo fita molde de DNA genômico em diferentes quantidades de acordo com as diluições efetuadas. As quantidades de DNA genômico empregadas como fita molde nas reações de amplificação variavam de aproximadamente 96,0 a 200,0ng de DNA nas amostras concentradas; de 19,2 a 40,0ng nas diluições 5X; de 4,0 a 8,0ng de DNA nas diluições 25X; e de 0,8 a 1,6ng nas diluições 125X. As condições de amplificação foram estabelecidas com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 92°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto; com uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Para estabelecer um controle positivo em tais condições experimentais, reações de amplificação também foram realizadas empregando como fita molde DNA genômico isolado a partir de *Escherichia coli*, como descrito por SAMBROOK et al. (1989). PCRs foram realizadas em duplicata para cada uma das concentrações testadas. A presença de um produto de amplificação de aproximadamente 500pb foi confirmada por eletroforese em géis de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e fotografados com câmera digital (Kodak, EUA). Controles negativos também foram estabelecidos durante as reações de amplificação, contendo mistura da reação de PCR na ausência de fita molde de DNA genômico.

3. RESULTADOS

Produto de amplificação de aproximadamente 500pb com alta intensidade de sinal, apresentando rastros correspondentes à amplificação não-específica de fragmentos, foi detectado nas PCRs empregando DNA genômico extraído a partir de conteúdo ruminal nas quantidades de 19,2 a 40ng (canaletas 1 e 2 na Figura 1A, canaletas 3 e 4 na Figura 1B). Amplificações da banda de interesse foram identificadas com alta intensidade de sinal nos produtos amplificados gerados a partir de DNA ruminal nas quantidades variando de 2,0 a 4,0ng, embora rastros de fragmentos não-específicos também tenham sido detectados nessas amostras (canaletas 3 e 4 na Figura 1A, canaletas 5 e 6 na Figura 1B). Uma banda de DNA correspondente ao produto de amplificação de aproximadamente 500pb foi revelada como um fragmento único de maior intensidade e alta especificidade a partir de

amostras de DNA genômico submetidas a diluições seriadas com concentrações variando de 0,8 a 1,6ng (canaletas 5 e 6 na Figura 1A, canaletas 7 e 8 na Figura 1B). Nenhuma amplificação foi observada nas amostras mais concentradas, contendo quantidades de DNA genômico variando de 96 a 200ng (canaleta 9 na Figura 1A, canaletas 1 e 2 na Figura 1B). Como demonstrado na Figura 1A (canaleta 7 e 8), produto amplificado de interesse com alta especificidade foi detectado nas reações de amplificação conduzidas a partir de 40ng de DNA genômico isolado de *E. coli* (controle positivo) nas mesmas condições experimentais.

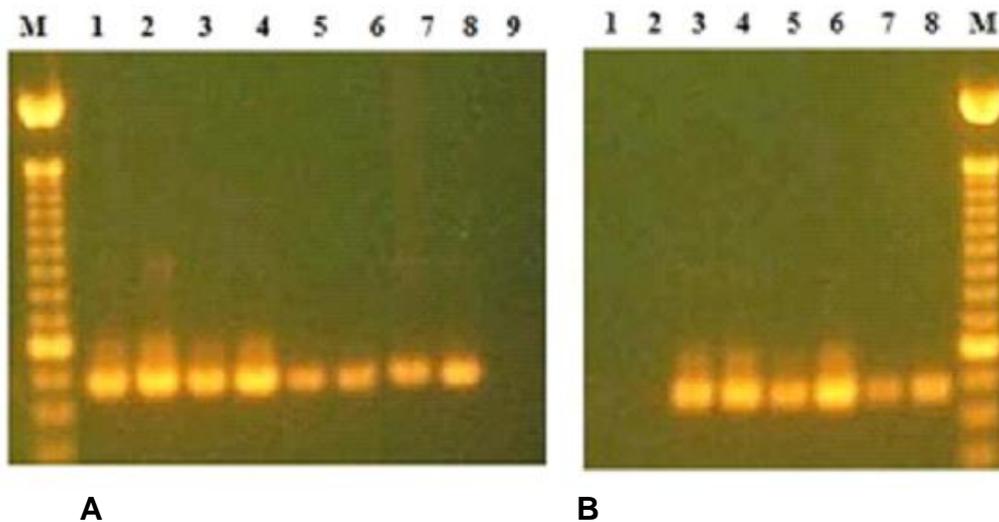


FIGURA 1. PRODUTOS DE AMPLIFICAÇÃO DE 500PB GERADOS A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FITAS MOLDES DE DNA GENÔMICO EXTRAÍDAS DE MICROBIOTA RUMINAL. (A) CANALETAS 1 E 2: APROXIMADAMENTE 10,0NG DE DNA GENÔMICO; CANALETAS 3 E 4: APROXIMADAMENTE 2,0NG DE DNA GENÔMICO; CANALETAS 5 E 6: APROXIMADAMENTE 0,8NG DE DNA GENÔMICO; CANALETAS 7 E 8: APROXIMADAMENTE 40NG DE DNA GENÔMICO DE *Escherichia coli* (CONTROLE POSITIVO); CANALETA 9: APROXIMADAMENTE 98NG DE DNA GENÔMICO. (B) CANALETAS 1 E 2: APROXIMADAMENTE 200NG DE DNA GENÔMICO; CANALETAS 3 E 4: APROXIMADAMENTE 40NG DE DNA GENÔMICO; CANALETAS 5 E 6: APROXIMADAMENTE 4,0NG DE DNA GENÔMICO; CANALETAS 7 E 8: APROXIMADAMENTE 1,6NG DE DNA GENÔMICO. M: PADRÃO DE PESO MOLECULAR DE 100 PB (100BP DNA LADDER, GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES).

4. DISCUSSÃO

Menores quantidades de fitas moldes de DNA genômico isoladas a partir de microbiota ruminal geraram um produto amplificado de interesse com maior especificidade e intensidade de sinal em comparação a ausência ou baixa eficiência de amplificação, quando empregadas quantidades de DNA genômico em concentrações tradicionalmente estabelecidas nos protocolos convencionais (Figura 1). Uma PCR com alta eficácia envolve alta especificidade, eficiência de produção e fidelidade de um produto de interesse. Tradicionalmente, a quantidade de DNA genômico necessária às reações de amplificação variam de 50 a 500 ng, embora a amplificação de diferentes genes geralmente exija otimização e padronização das quantidades adequadas de DNA requeridas nas análises moleculares (SHEIKH & LAZARUS, 1997). Particularmente, nas amplificações de amostras de DNA genômico bacteriano ou DNA plasmidial que representam genomas muito menos complexos, quantidades correspondentes a picogramas (10⁻¹² g) e a nanogramas (10⁻⁹ g) são suficientes em tais reações (SAMBROOK et al., 1989, COEN, 1991).

Inúmeros fatores podem afetar a dinâmica de amplificação, tendo sido cogitado que a própria molécula de DNA, para estabilizar sua estrutura, pode atuar como forte agente quelante, ligando-se aos íons de magnésio, cofator essencial para que a enzima Taq DNA polimerase catalise as reações de amplificação, o que efetivamente bloqueia a reação de amplificação (SEREC et al., 2016). Tal comportamento de captura dos íons de magnésio pela própria molécula de DNA durante as PCRs também pode ser observado na presença de primers ou mesmo de desoxirribonucleotídeos dNTPs em excesso na solução. Além disso, ZHU et al. (2016) demonstraram que as enzimas DNA polimerases de revisão, usualmente empregadas para amplificação de fragmentos de DNA com alta precisão, podem ser inibidas por sequências de iniciadores ricos na base nitrogenada guanina (GGGGG e GGGGHGG), provocando a inibição da PCR por estas DNAs polimerases. Uma outra possibilidade para a inibição da reação enzimática *in vitro* e consequente não amplificação de genes alvos refere-se à presença de substâncias inibidoras nas PCRs provenientes do isolamento das amostras de DNA (KREADER, 1996, SCHRADER et al., 2012). Possíveis explicações para justificar a ação inibitória dessas substâncias podem envolver a inativação da enzima DNA polimerase Taq ou mesmo a modificação da estrutura do DNA, promovendo o consequente bloqueio do reconhecimento e do anelamento dos iniciadores à fita molde (YU & MORRISON, 2004). Mesmo nos protocolos experimentais especialmente adaptados para extrair amostras de DNA genômico livres de substâncias inibitórias, faz-se necessário frequentemente submeter tais

amostras a colunas purificadoras de resinas de retenção dessas impurezas. Sendo assim, a ausência de sinais de amplificação observada na presença de maiores quantidades de fitas moldes de DNA genômico extraídas de líquido ruminal pode ser o resultado de resquícios de substâncias inibitórias ainda presentes nessas preparações, mesmo tendo sido empregado um protocolo de extração de DNA com alta eficácia para eliminação desses componentes (Figura 1).

A reação em cadeia da polimerase envolve uma ação enzimática *in vitro* altamente sensível a fim de amplificar fragmentos de DNA específicos e a presença de resíduos de diferentes naturezas pode afetar significativamente a ação da enzima polimerase. Embora alguns métodos experimentais priorizem o isolamento de DNA genômico a partir de microbiota ruminal com alto grau de pureza e sem a presença de agentes inibitórios, muitos desses protocolos ainda exigem a necessidade de submeter tais amostras à filtração adicional em colunas purificadoras, contendo resinas específicas para promover sua conexão e subsequente remoção de substâncias inibitórias (FLINT & THOMSON, 1990). O uso de tais acessórios frequentemente torna-se inviável em experimentos destinados à análise de amostras em grande número devido ao alto custo dessas colunas purificadoras e de suas resinas de filtração. Nesse contexto, torna-se extremamente importante determinar estratégias metodológicas para maximizar análises moleculares de populações complexas de múltiplos micro-organismos de ruminantes.

Desta forma, as descobertas descritas nesse estudo demonstram que menores quantidades àquelas tradicionalmente recomendadas para serem empregadas nas amplificações *in vitro* a partir de fitas moldes de DNA genômico provenientes de comunidades microbianas ruminais ricas em agentes inibitórios, produzem produtos amplificados de interesse com alta especificidade e intensidade. Tais achados podem proporcionar uma alternativa adicional para garantir a caracterização molecular e a elucidação de interações intrínsecas entre micro-organismos típicos da microflora do trato digestório de ruminantes.

5. REFERÊNCIAS

BORDIM S, CEDROLA F, D'AGOSTO M, *et al.* 2016. Microscópicos e eficientes: importância dos microrganismos no ambiente ruminal. *Revista Brasileira de Zootecias*, 17: 28-30.

COEN DM. The polymerase chain reaction. *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing/Wiley Interscience, New York, 1991.

FLINT HJ, THOMSON AM. 1990. Deoxyribonuclease activity in isolated rumen bacteria and rumen fluid. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 18-21.

FREITAS KC, GABRIEL JE, LEITE LC, *et al.* 2008. Molecular characterization of ruminal bacterial diversity in vitro. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, 30: 187-192.

KRAUSE DO, SMITH WJ, MCSWEENEY CS. 2001. Extraction of microbial DNA from rumen contents containing plant tannins. *BioTechniques*, 31: 294-299.

KREADER CA. 1996. Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1102-1106.

MOREIRA D. 2001. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Research*, 26: 3309-3310.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

SCHRADER C, SCHIELKE A, ELLERBROEK L, *et al.* 2012. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113: 1014-1026.

SEREC K, BABIĆ SD, PODGORNIK R, *et al.* 2016. Effect of magnesium ions on the structure of DNA thin films: an infrared spectroscopy study. *Nucleic Acids Research*, 44: 8456-8464.

SHARMA R, JOHN SJ, DAMGAARD DM, *et al.* 2003. Extraction of PCR-quality plant and microbial DNA from total rumen contents. *BioTechniques*, 34: 92-97.

SHEIKH SN, LAZARUS L. 1997. Re-usable DNA template for the polymerase chain reaction (PCR). **Nucleic Acids Research**, 25: 3537–3542.

YU Z, MORRISON M. 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*, 36: 808-812.

ZHU X-J, SHUHUI SUN, BINGHUA XIE, *et al.* 2016. Guanine-rich sequences inhibit proofreading DNA polymerases. *Scientific Reports*, 6: 28769.