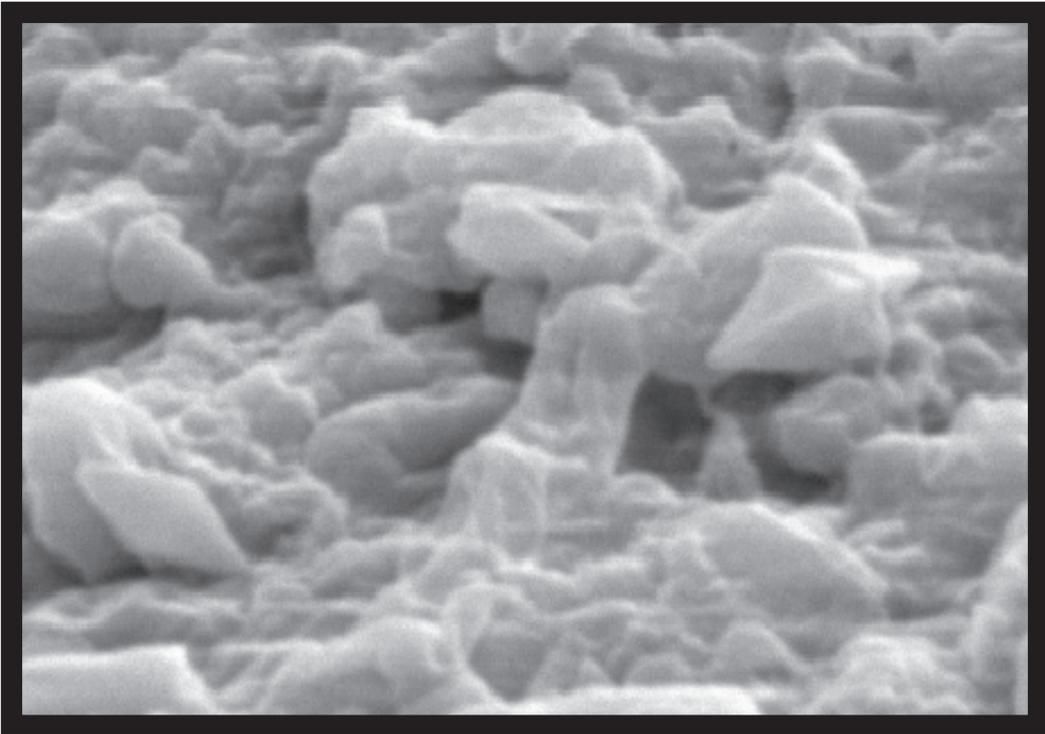


Comparação de Métodos de Extração de DNA para Caracterização Molecular de *Bacillus thuringiensis*



ISSN 1679-0154

Novembro, 2011

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 44

Comparação de Métodos de Extração de DNA para Caracterização Molecular de *Bacillus thuringiensis*

Thaís Barros Rodrigues
Fernando Hercos Valicente
Edilson Paiva

Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2011

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Sidney Netto Parentoni
Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau
Membros: Flávia Cristina dos Santos Flávio Dessaune Tardin, Eliane Aparecida Gomes, Paulo Afonso Viana, Guilherme Ferreira Viana e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros
Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro
Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa
Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa
Foto(s) da capa: Marcio Martineli

1ª edição

1ª impressão (2011): on line

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 Milho e Sorgo**

Rodrigues, Taís Barros.

Comparação de métodos de extração de DNA para caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis* / Taís Barros Rodrigues, Fernando Hercos Valicente, Edilson Paiva. -- Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2011.

14 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1619-0154; 44).

1. Controle biológico. 2. Bactéria. 3. Gene. I. Valicente, Fernando Hercos. II. Paiva, Edilson. III. Título. IV. Série.

CDD 632.96 (21. ed.)

© Embrapa 2011

Sumário

Introdução	5
Material e Métodos	7
Resultados e Discussão	10
Conclusões	11
Referências	12

Comparação de métodos de extração de DNA para caracterização molecular de *Bacillus thuringiensis*

Thaís Barros Rodrigues¹

Fernando Hercos Valicente²

Edilson Paiva³

Introdução

Bacillus thuringiensis é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica ou facultativamente anaeróbica (RASKO et al., 2005), em forma de bastonete, formadora de esporos e que tem a capacidade de produzir, durante a esporulação, diversas inclusões protéicas cristalinas altamente específicas, que são responsáveis pela atividade tóxica desta espécie (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000; HABIB; ANDRADE, 1998), conhecidas como proteínas Cry e Cyt, produtos da expressão dos genes *cry* e *cyt*, respectivamente.

Cry e Cyt são δ -endotoxinas e a definição de uma proteína Cry e Cyt é bastante ampla: uma inclusão protéica parasporal (cristal) de *B. thuringiensis* que exibe algum efeito tóxico experimentalmente verificável para um organismo alvo ou qualquer proteína que tenha similaridade de seqüência para uma proteína Cry conhecida (CRICKMORE et al., 1998).

¹Bióloga, Doutoranda em Biotecnologia Vegetal, Estagiária na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. thaisbarros_bio@yahoo.com.br

²Eng. Agr., Ph.D. Controle Biológico/Biologia Molecular. Embrapa Milho e Sorgo Sete Lagoas, MG. valicent@cnpms.embrapa.br

³Eng. Agr., Ph.D Biotecnologia Vegetal. Pesquisador aposentado da Embrapa Milho e Sorgo.

B. thuringiensis é um dos microorganismos entomopatógenos mais importantes do ponto de vista científico e industrial, devido a um conjunto de características desejáveis, principalmente ao seu modo de ação e a sua especificidade. É a espécie mais estudada, tendo sido isolados inúmeros sorotipos, em diferentes regiões do mundo. Destacam-se por sua importância como biolarvicidas algumas sorovariedades como *aizawai*, *israelensis*, *kurstaki* e *tenebrionis*, todas com importante aplicação na saúde pública e na agricultura, sendo recomendadas para combater uma série relativamente grande de insetos das ordens Coleoptera, Diptera, e Lepidoptera (GLARE; O'CALLAGHAN 1998; JOUNG; CÔTÉ, 2000).

Os genes cry podem estar localizados tanto nos cromossomos quanto nos megaplasmídeos (40-200MDa) ou em ambos (GONZÁLES et al., 1982; SANCHIS et al., 1998). Além disso, existem cepas de Bt que apresentam um único gene codificador enquanto outras apresentam genes diferentes, porém relacionados (POLANCZYK; ALVES, 2003).

Além das endotoxinas, outra classe de proteínas que podem contribuir para a virulência de *B. thuringiensis* em insetos-praga específicos são as proteínas vegetativas, Vip (genes *vip*), produzidas e secretadas durante as fases vegetativas e de esporulação (ESTRUCH et al., 1996) e possuem, assim como as proteínas formadoras de cristais, elevada toxicidade para lepidópteros como *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea* (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000).

B. thuringiensis é o principal agente no controle biológico de pragas, sendo responsável por mais de 90% do total das vendas de biopesticida (GLARE; O'CALLAGHAM, 2000), tendo sido utilizado no campo durante os últimos 50 anos (ALI et al., 2010). Além disso, possui papel de destaque na geração de plantas geneticamente modificadas, sendo seus genes utilizados em 100% dos transgênicos resistentes a insetos disponíveis no mercado.

A prospeção de novos genes de *B. thuringiensis* depende de várias técnicas moleculares sendo a maioria baseadas em PCR (Polymerase Chain Reaction, ou seja, Reação da Polimerase em Cadeia).

A técnica de PCR é executada inteiramente *in vitro* sem o uso de células, possibilitando a síntese de fragmentos de DNA, a partir de DNA molde pré-extraído, usando a enzima *Taq* DNA polimerase, que é termoestável. A reação se baseia no pareamento de um par de oligonucleotídeos (iniciadores ou *primers*) na fita de DNA alvo e extensão do fragmento delimitado pela sequência de fita dupla formada entre a fita de DNA e o iniciador. A extensão desse fragmento previamente conhecido se dá a partir da extremidade 3' OH livre do iniciador. Esses iniciadores são sintetizados artificialmente de modo que suas sequências sejam complementares as sequências extremas do fragmento desejado (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1998; NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A grande maioria das extrações de DNA utilizadas em trabalhos de caracterização genética de *B. thuringiensis* é baseada em técnicas de choque térmico sem purificação do material genético (BRAVO et al., 1998; PORCAR; PEREZ, 2003; SAUKA et al., 2010; VALICENTE et al., 2010). Já para outros métodos moleculares, como a análise de diversidade genética pela técnica de rep-PCR, há necessidade de um DNA de melhor qualidade e purificação (SHUHAIMI et al., 2001).

O objetivo desse trabalho foi comparar dois métodos de extração de DNA (choque térmico e purificação) para caracterização genética de *B. thuringiensis*.

Material e Métodos

As cepas utilizadas para extração do DNA usando ambos os métodos foram: 344 *Bt tolworthi* e 1657. Todas as cepas pertencem ao banco de *B. thuringiensis* da coleção de microrganismos da Embrapa Milho

e Sorgo. Os *primers* testados foram descritos por Cerón et al. (1994, 1995) e amplificam os genes *cry1D* e *cry1Ea/Eb*.

Para eliminar resultados falso-positivos, PCR multiplex foi realizada utilizando além dos *primers para genes cry*, *primer* para amplificação do gene 16S RNA ribossomal, sendo esta subunidade encontrada no RNA ribossomal de procariontes (LANE, 1991; NUBEL et al. 1996).

Extração e purificação de DNA

O DNA das cepas de Bt foi extraído e purificado de acordo com Shuhaimi et al. (2001), com algumas modificações. As cepas foram plaqueadas em meio LB sólido e mantidas à temperatura de 30°C por aproximadamente 16 horas. Com o auxílio de uma alça de platina, toda a massa celular foi raspada e transferida para um microtubo e ressuspensa em 1000 µL de solução tampão (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl e 10 mM EDTA, pH8) e lisozima na concentração de 20 mg/mL, sendo levado ao banho-maria a 37 °C por 30 min. Adicionaram-se 25 µL de SDS 10% e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) seguido de incubação à 60 °C por 1h.

Após esse período, 500 µL de fenol/clorofórmio/octanol (25:24:1) foram adicionados seguido de centrifugação por 2 min a 12000 g. Transferiram-se 300 µL da fase aquosa (superior) para um novo tubo, acrescentou-se o mesmo volume de acetato de potássio 3M e o dobro do volume de álcool isopropanol, verteu-se suavemente e centrifugou-se a 12000 g por 10 min.

O sobrenadante foi cuidadosamente descartado, o pellet foi lavado com 300 µL de etanol 70% e novamente centrifugado a 12000 g por 5 min. Novamente descartou-se o sobrenadante e secou-se o pellet de forma que não ficasse resíduo de etanol e ressuspendeu-se em 150 µL de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0 e EDTA. 1mM pH 8,010) .

A qualidade do DNA foi observada através de corrida eletroforética em gel de agarose 1% e suas quantificações se deram através do aparelho Nanodrop (ND-1000 V3.1.2 - Spectrophotometer) As amostras de trabalho foram diluídas para a concentração de 10 ng/μL, a partir da solução concentrada e armazenadas a 4 °C. As amostras concentradas foram armazenadas a -20 °C.

Extração de DNA por choque térmico

O DNA das mesmas cepas de *B. thuringiensis* extraídas pelo método anterior, foi isolado de acordo com Bravo et al. (1998), com algumas modificações.

As cepas foram plaqueadas em meio LB sólido e incubadas a 30°C por 16 horas. Com um palito de dente autoclavado foi coletada uma pequena amostra e transferida para um microtubo contendo 100 μL de água ultra pura estéril. Em seguida, os microtubos foram acondicionados em freezer -80°C por 15 minutos. Após este período, os tubos foram levados ao banho-maria com água fervente por 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm por 10 segundos, e o sobrenadante foi coletado e utilizado, em no máximo 2h, nas reações de PCR.

Para as reações de amplificação foram utilizados microtubos de 0,2 mL, com um volume final de 20 μl sendo constituída de 30 ng de DNA purificado, 3 mM de MgCl₂, tampão 10 X (20 mM de Tris e 50 mM de KCl), 250 μM de dNTP, 20 μM de cada *primer* 'e 2 unidades de *Taq DNA Polimerase*. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os produtos de amplificação foram separados em géis horizontais de agarose 2%. Após a corrida o gel foi corado em brometo de etídio (1μg/mL) durante 5 minutos e descorado em água por 15 minutos, sendo visualizado sob luz ultravioleta e as imagens captadas pelo fotodocumentador Kodak Gel Logic 200 Imaging System.

As condições utilizadas no termociclador foram: 95 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, temperatura de anelamento (*cry1D*: 55 °C e *cry1Ea/Eb*: 50 °C) por 1 min e 72 °C por 1 min. Após os ciclos, as reações foram submetidas a 72 °C por 10 minutos.

Resultados e Discussão

Os resultados das reações de PCR foram avaliados e podem ser observados na Figura 1.

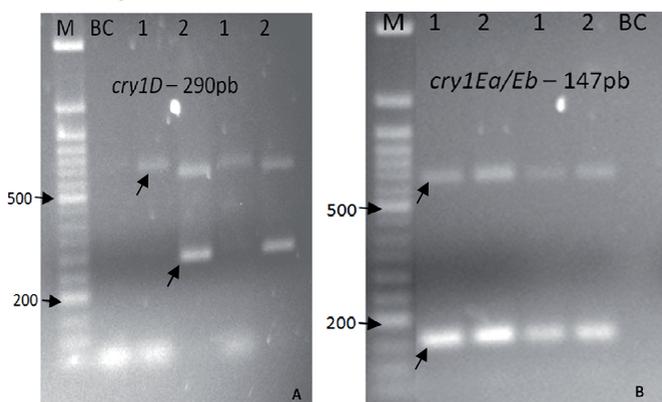


Figura 1. Gel de agarose 2% com os resultados de ampliações de PCR dos genes *cry1D* (290pb), com a cepa 344 (A) e *cry1Ea/Eb* (147pb), com a cepa 1657 (B). M: Marcador de Peso Molecular de 50pb; BC: Branco; 1: DNA extraído por choque térmico; 2: DNA extraído e purificado.

Nas ampliações da reação com o *primer* *cry1Ea/Eb* e a cepa 1657 (B) não foram observadas diferenças com relação ao modo de extração de DNA. Todos os produtos da PCR obtiveram bandas de 600pb (correspondentes ao gene 16S, utilizado para controle de falsos negativos) e de 147pb (correspondente ao gene *cry1Ea/Eb*).

Já as ampliações da reação com o *primer* *cry1D* e cepa 344 (A) foram observadas diferenças com relação ao modo de extração de

DNA. Apesar de todos os produtos da PCR apresentarem a banda de 600pb, apenas os produtos provenientes de DNA extraído e purificado apresentaram a banda esperada para o gene correspondente *cry1D* (290pb).

Os resultados sugerem uma maior estabilidade dos produtos da PCR utilizando DNA extraído e purificado sendo o DNA por choque térmico menos estável, aumentando a possibilidade de falsos negativos.

Além da maior confiabilidade, outra vantagem da utilização do método de extração e purificação de DNA para estudos de caracterização genética é o tempo útil do material extraído. O tempo útil recomendado para o DNA por choque térmico é de no máximo 1 dia, tendo sempre a necessidade de extrair o DNA, o que pode ser trabalhoso e de custo elevado dependendo da quantidade de amostras e *primers* utilizados. Já o DNA purificado pode ser utilizado por longo período de tempo se armazenados em geladeira e por um tempo ainda maior se acondicionados a -20 °C.

Conclusões

O método de extração de DNA seguido de purificação é mais estável, repetível, menos trabalhoso, por ter uma maior durabilidade do material extraído, e economicamente vantajoso quando comparado ao método de extração de DNA por choque térmico.

Para a caracterização de genes de *B. thuringiensis* o método de extração de DNA mais indicado é o seguido de purificação.

Referências

ALI, S.; ZAFAR, Y.; ALI, G. M.; NAZIR, F. . *Bacillus thuringiensis* and its application in agriculture. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 14, p. 2022-2031, Apr. 2010.

BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPES, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PEÑA, G.; NUÑES-VALDEZ, M. E.; SOBERÓN, M.; QUINTERO, R. . Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4965-4972, 1998.

CERÓN, J. L.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; LINA, L.; BRAVO, A. . PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 353-356, 1994.

CERÓN, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GÜERECAL, L.; BRAVO, A. . Specific PCR primers to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 3826-3831, 1995.

CRICKMORE N. ; ZEIGLER, D.R.; FEITELSON, J.; SCHNEPF, E.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; DEAN, D.H. Revision of nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* presticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 3, p. 807-813, 1998.

ESTRUCH, J. J.; WARREN, G. W.; MULLINS, M. A.; NYE, G. J.; CRAIG, J. A.; KOZIEL, M. G. . *Vip3A*, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 11, p. 5389-5394, 1996.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de**

marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA CENARGEN. Documentos, 20).

GLARE, T. R.; O' CALLAGHAN, M. **Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis***. 1998. Report for the Ministry of Health, Grasslands, New Zealand. Division, AgResearch, Lincoln. Disponível em: <<http://www.beyondpesticides.org/mosquito/documents/BacillusThuringiensisIsraelensisNZ.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2011.

GLARE, T. R.; O'CALLAGHAN M. ***Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety**. Chichester: John Wiley, 2000.

GONZÁLES, J. M. J.; BROWN, B. S.; CARLTON, B. C. Transfer of *Bacillus thuringiensis* to *Bacillus cereus*. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington, v. 79, n. 22, p. 6951-6955, 1982.

HABIB, M. E. M.; ANDRADE, C. F. S. Bactérias entomopatogênicas. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 383-446.

JOUNG, K. B.; COTÉ, J. C. **A Review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis***. Saint-Jean-sur-Richelieu: Horticultural Research and Development Centre, 2000 (Technical Bulletin n. 29). Disponível em: <<http://dsp-psd.pwgsc.gc.ca/Collection/A54-9-29E.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2011.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 33, p. 10-13, 2004.

NUBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence

heterogeneities of genes encoding 16S electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 19, p. 5636-5643, 1996.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. B. *Bacillus thuringiensis*: uma breve revisão. **Agrociência**, Texcoco, v. 7, n. 2, p. 1-7, 2003.

PORCAR, M.; JUAREZ-PEREZ, V. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 419-432, 2003.

RASKO, D. A.; ALTHER, M. R.; HAN, C. S.; RAVEL, J. . Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 303-329, 2005.

SANCHIS, V.; LERECLUS, D.; MENOUE, G.; CHAUFAX, J.; LECADET, M. M. . Multiplicity of d endotoxinas genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 2., n. 2, p. 393-404, 1998.

SAUKA D. H.; BASURTO-RIOS, R. E.; IBARRA, J. E.; BENINTENDE, G. B. Characterization of an Argentine Isolate of *Bacillus thuringiensis* Similar to the HD-1 Strain. **Biological Control**. San Diego, v. 39, n. 5, p. 767-773, 2010.

SHUHAIMI, M.; ALI, A. M.; SALEH, N. M.; YAZID, A. M. I. Utilization of enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence-based PCR to fingerprint the genomes of *Bifidobacterium* isolates and other probiotic bacteria. **Biotechnology Letters**, Surrey, v. 23, n. 9, p. 731-736, 2001.

VALICENTE, F. H.; TOLEDO, P. de; EDGARD, A.; VASVONCELOS, M. J. V. de; CARNEIRO, N. P.; CARNEIRO, A. A.; GUIMARAES, C. T.; LANA, U. G. . Molecular characterization and distribution of *Bacillus thuringiensis cry1* genes from Brazilian strains effective against the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Biological Control**, San Diego, v. 53, p. 360-366, 2010.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA